

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service with sufficient postage as First Class Mail, in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date shown below.

Dated: January 5, 2005

Signature: 

(Michael H. Teschner)

Docket No.: EGYPT 3.9-030 CONT  
(PATENT)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Gérard Quentin

Confirmation No. 2993

Application No.: 10/751,601

Group Art Unit: 1614

Filed: January 5, 2004

Examiner:

For: NOVEL CHROMOGENIC SUBSTANCES AND  
USE THEREOF FOR THE  
DETERMINATION OF  
CARBOXYPEPTIDASE ACTIVITIES

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
France	0109030	07/06/2001

In support of this claim, a certified copy of the original foreign application is filed herewith.

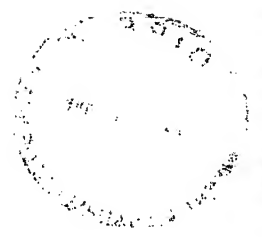
Dated: January 5, 2005

Respectfully submitted,

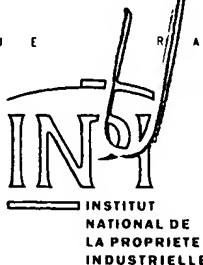
By 

Michael H. Teschner

Registration No.: 32,862  
LERNER, DAVID, LITTENBERG,  
KRUMHOLZ & MENTLIK, LLP  
600 South Avenue West  
Westfield, New Jersey 07090  
(908) 654-5000  
Attorney for Applicant



THIS PAGE BLANK (USPTO)

01 07 03 0 -  
7.11.03

2.

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE CERTIFIÉE CONFORME

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 31 octobre 2003.

Fait à Paris le 29 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

Martine PLANCHE

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

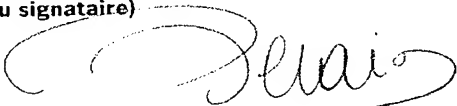



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>06 JUIN 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0109030</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>06 JUIN 2001</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> B4947-AD			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date ____/____/____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> NOUVEAUX SUBSTRATS CHROMOGENES ET LEUR UTILISATION POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITE DE CARBOXYPEPTIDASES.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		SOCIETE DIAGNOSTICA-STAGO	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme à Directoire	
N° SIREN		. . . . .	
Code APE-NAF		. . . . .	
Adresse	Rue	9 rue des Frères Chausson	
	Code postal et ville	92600   ASNIERES	
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT 0109030 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		B4947-AD	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		DESAIX	
Prénom		Anne	
Cabinet ou Société		ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 rue Chauveau-Lagarde	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 44 51 18 00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 42 66 08 90	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		info@egyp.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<input checked="" type="checkbox"/> <b>RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) DESAIX Anne CPI n° 93.3006		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  	

## NOUVEAUX SUBSTRATS CHROMOGENES ET LEUR UTILISATION POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITE DE CARBOXYPEPTIDASES.

5 La présente invention est relative à des composés chromogènes et leur utilisation pour le dosage d'enzymes de la famille des carboxypeptidases N, et des carboxypeptidases U. Elle vise plus spécifiquement l'utilisation desdits composés pour le dosage de l'activité du TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) dans un échantillon sanguin et la méthode de dosage correspondante.

10

Les carboxypeptidases (CP) constituent un groupe d'enzymes au sein de la famille des exopeptidases. Ce sont des enzymes qui coupent les liaisons amide des chaînes polypeptidiques au niveau du dernier acide aminé COOH-terminal. Elles comprennent les sérine carboxypeptidases, les cystéine carboxypeptidases et les

15 métallocalcarboxypeptidases.

De nombreuses carboxypeptidases ont été isolées et séquencées, chez les bactéries, les levures et les végétaux. Ces enzymes sont également présentes dans un grand nombre de tissus chez les mammifères.

20

Des carboxypeptidases ont notamment été isolées au niveau du pancréas et dans des mastocytes. D'autres carboxypeptidases circulantes dans le plasma ont également été clonées, isolées et séquencées.

25 Toutes ces enzymes ont un rôle IN VIVO dépendant à la fois de leur localisation et de leurs propriétés physiques. Ainsi les carboxypeptidases se classent différemment selon leur spécificité de substrat. Les carboxypeptidases A ont un spectre relativement large : elles hydrolysent la liaison peptidique C-terminale du dernier acide aminé préférentiellement s'il est hydrophobe (Phe, Leu, Val, Ala).

30 Elles hydrolysent plus lentement les acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu) ainsi que la glycine (Gly), et n'hydrolysent pas du tout les acides aminés basiques tels que l'arginine (Arg), la lysine (Lys), l'histidine (His) ou l'ornithine (Orn), un

homologue inférieur de la lysine, ni les acides aminés secondaires tels que la proline (Pro) ou l'hydroxyproline (Hyp).

Les carboxypeptidases B hydrolysent spécifiquement les derniers acides aminés basiques C-terminaux, tels que Arg, Lys. Cette classe d'enzymes se subdivise en sous-classes constituées par les carboxypeptidases H (également dénommée encéphaline convertase ou carboxypeptidase E), M, N et U.

La carboxypeptidase E a été localisée dans les granules sécrétoires des îlots pancréatiques, les glandes surrénales et pituitaires, et le cerveau. La carboxypeptidase M est une enzyme membranaire présente dans de nombreux tissus et cellules en culture.

La carboxypeptidase N (désignée parfois ci-après CPN) est une enzyme circulante dans le plasma. Elle protège l'organisme contre l'effet vasoactif et inflammatoire de peptides contenant un acide aminé basique C-terminal (de préférence une lysine), libérés dans la circulation. Cette enzyme existe sous sa forme active dans le sang. Elle est également dénommée kininase du fait de ses substrats naturels qui sont la bradykinine, les kinines, les anaphylatoxines.

Enfin, les carboxypeptidases U (unstable) (désignés parfois ci-après CPN) sont des enzymes qui hydrolysent également les acides aminés basiques C-terminaux, avec une préférence pour les arginines, mais qui, contrairement aux carboxypeptidases N, sont très instables lorsqu'elles se trouvent sous leur forme activée.

Une revue générale récente sur les enzymes de la famille des carboxypeptidases a été réalisée par BOUMA et al. (1).

Le TAFI est une métallo-carboxypeptidase à zinc basique (1-4). C'est plus précisément une carboxypeptidase U, car son activité est instable à 37° C. Cette enzyme, dont l'ADNc et la séquence d'acides aminés correspondante chez



l'homme sont par exemple décrits dans le brevet US 5,206,161, est une protéine plasmatique dont le rôle dans la régulation de la fibrinolyse a été initialement envisagé à partir de l'observation IN VITRO d'un retard de la lyse du caillot en présence de TAFI activé.

5

Le TAFI clive les résidus arginine et lysine exposés en position COOH-terminale sur la fibrine en cours de dégradation. Cette hydrolyse conduit à une diminution du nombre de sites de fixation du plasminogène et du tPA à la surface du caillot de fibrine, et donc une diminution de la transformation du plasminogène en plasmine par le tPA.

10

Le TAFI a été successivement identifié sous le nom de procarboxypeptidase B (pro-PCPB) puis de procarboxypeptidase instable (proCPU : Unstable ProCarboxypeptidase) et procarboxypeptidase R (CPR), du fait d'une activité carboxypeptidasique sur les résidus arginine. La forme zymogène est une glycoprotéine à chaîne unique de 60 KDa synthétisée dans le foie et circulante dans le plasma.

15

Le clivage du zymogène est réalisé par la thrombine au niveau du site arg 92. Cette protéolyse libère un peptide N-terminal de 92 acides aminés contenant plusieurs sites de glycosylation. L'action catalytique de la thrombine sur le TAFI est considérablement augmentée par la thrombomoduline en présence d'ions divalents. La vitesse d'activation du TAFI catalysée par la thrombine est ainsi accrue plus de 1000 fois du fait de la formation d'un complexe ternaire avec la thrombomoduline.

20

25

Le TAFI activé (TAFIa) est constitué par le domaine catalytique C-terminal du zymogène et comporte 309 acides aminés.

Du fait de son rôle clef dans les mécanismes de régulation du processus de la fibrinolyse, il s'est rapidement avéré utile de pouvoir mesurer la quantité de TAFI

30

activé constitutionnel et de TAFI activable présent dans le plasma dans différents états pathologiques.

Plusieurs méthodes de dosage de l'activité de diverses carboxypeptidases  
5 utilisant des substrats spécifiques ont été décrites dans l'état de l'art.

Ainsi, WOLFF et al. (5) ont comparé les performances des substrats synthétiques Hip-Arg, Hip-Lys, Hip-Orn sur les carboxypeptidases B pancréatiques purifiées par chromatographie en mesurant les différences d'absorption en UV.  
10

En 1970, S. SUZUKI et al. (6) ont amélioré la détection du produit d'hydrolyse en dérivatisant la benzoylglycine libérée par le réactif TT (2, 4, 6 Trichloro-5-Triazin). Cette dérivation opérait spécifiquement sur le CH<sub>2</sub> de la glycine en α d'une  
15 fonction acide libre uniquement. Ce dérivé devient jaune vif (longueur d'onde maximale à 382 nm).

Cette méthode de développement de coloration jaune sur les restes Hippuryl a largement été utilisée par de nombreux auteurs par la suite.  
20

En 1972, K. LORENTZ et al. (7) ont utilisé une réaction de coloration de l'arginine libérée cette fois par action des carboxypeptidases B sur un substrat Hip-Arg en utilisant la p-benzoquinone comme réactif. De cette manière, le dérivé coloré à une longueur d'onde maximale à 480 nm.

25 En 1980, Th. H. Plummer et al. (8) ont utilisé un substrat synthétique : le Furylacryloyl-Ala-Lys pour quantifier les carboxypeptidases N, la lecture se faisant à 324 nm (proche UV mais non visible).

30 En 1985, G.H. Fischer et al. (9) ont utilisé un substrat fluorescent par dansylation N-terminale d'un peptide spécifique de la carboxypeptidase à doser. Ce dosage

nécessitait une étape d'extraction des produits d'hydrolyse pour une bonne séparation des espèces avant lecture.

En 1986, H. SARUTA et al. ont déterminé par une méthode colorimétrique, l'activité de la carboxypeptidase A (10). Ceux-ci ont utilisé une enzyme spécifique : "l'Hippuricase" pour hydrolyser le dérivé hippuricyle lui-même obtenu par hydrolyse du substrat hydroxy-hippuricyle-Phg par la CPA. Cette réaction était révélée finalement par le 4-Aminoantipyrine pour donner un colorant quinoneimide absorbant à 505 nm.

10

En 1998, NAM JOO HONG et al. ont utilisé un substrat synthétique avec un analogue de l'arginine, le thiaarginine pour doser les CPB (11).

Toutefois, les méthodes colorimétriques décrites ci-dessus soit n'ont jamais été utilisées pour doser spécifiquement l'activité enzymatique de CPN ou CPU, notamment le TAFI, soit présentent certains inconvénients incompatibles avec un test de dosage simple et efficace de ce type d'enzyme par colorimétrie.

15

En effet, selon les cas considérés :

- 20 - soit la réaction de dérivatisation aboutissant à un produit coloré n'est pas spécifique des espèces libérées lors de l'hydrolyse,
- soit les réactifs de dérivatisation sont très toxiques et ne peuvent pas être utilisés à l'échelle industrielle,
- soit la méthode de révélation colorée est trop longue et contraignante et ne
- 25 peut être automatisée aisément.

En 1996, W.L. Mock et al. ont décrit une méthode de dosage d'une endoprotéase à zinc extracellulaire d'origine bactérienne, la thermolysine, à l'aide de substrats synthétiques se décolorant sous l'action de l'hydrolyse enzymatique (12). Pour ce faire, les auteurs ont synthétisé des composés dipeptidiques constitués d'un

30

niveau de la fonction amine, et d'un autre acide aminé neutre (Leu, Ala, Phe ou Gly).

5 L'incorporation du groupement arazoformyl donne lieu à un composé fortement coloré. En présence de la thermolysine, la molécule de colorant se réarrange pendant la réaction chimique d'hydrolyse selon un mécanisme bien décrit dans (12 - 13), donnant naissance à des produits non colorés (fragment anizole, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et acide aminé). Il est donc aisé de suivre la vitesse de l'enzyme par la vitesse de décoloration du milieu.

10

Les mêmes auteurs ont également décrit une méthode cinétique de dosage par spectrophotométrie basée sur le même principe que la précédente pour la carboxypeptidase A (13) et la carboxypeptidase B porcine pancréatique (14).

15 Dans ce cas, les composés utilisés étaient constitués d'un seul acide aminé connu pour être clivé par la carboxypeptidase A (Phé, Leu) ou la carboxypeptidase B (Lys), portant un groupement N-arazoformyl. Le clivage enzymatique de ces composés en produits non colorés, était suivi par mesure de la décroissance de coloration du milieu.

20

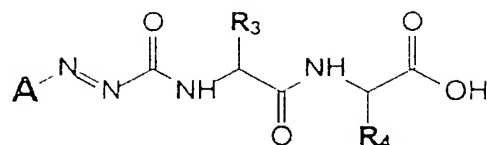
Partant de ces enseignements, les auteurs de la présente invention ont synthétisé de nouveaux composés colorés pour doser par méthode colorimétrique l'activité de carboxypeptidases N, ou de carboxypeptidases U, et plus particulièrement, l'activité du TAFI.

25

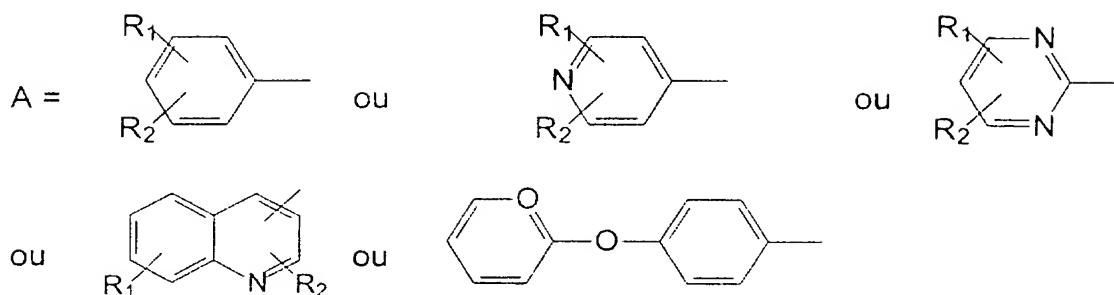
Selon un premier aspect, la présente invention a donc pour objet de nouveaux composés, constituant des substrats de carboxypeptidase N ou U, et plus particulièrement des substrats du TAFI activé. Ces composés sont des substrats chromogènes.

30

Les composés de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit des composés arazoformyl de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :



5

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Cl, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -SCH<sub>3</sub>

- R<sub>3</sub> = un radical d'acide aminé hydrolysable par une carboxypeptidase A.

10 - R<sub>4</sub> = un radical d'acide aminé basique.

Plus particulièrement, R<sub>3</sub> est choisi parmi les radicaux d'acides aminés hydrophobes tels que :

- la phenylalanine R<sub>3</sub> =

- l'alanine R<sub>3</sub> = -CH<sub>3</sub>

15

- la valine R<sub>3</sub> = -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

- la leucine R<sub>3</sub> = -CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

20 - l'isoleucine R<sub>3</sub> =

- la phenylglycine  $R_3 = \text{---} \text{C}_6\text{H}_5$

5 R4 est plus précisément choisi parmi les radicaux d'acides aminés tels que :

- l'arginine  $R_4 = \text{---} (\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{NH} \text{---} \text{C} \begin{matrix} \text{NH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$

- la lysine ( $R_4 = \text{---} (\text{CH}_2)_4 \text{---} \text{NH}_2$ )

- l'ornithine  $R_4 = \text{---} (\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{NH}_2$

10 De préférence,  $R_3$  représente la phenylalanine, et  $R_4$  l'arginine ou la lysine.

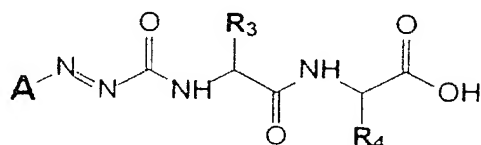
$R_1$  est de préférence choisi parmi :

-H et  $\text{---CH}_3$ , et,  
15

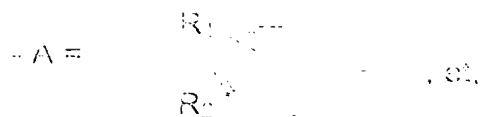
$R_2$  de préférence choisi parmi :

$\text{---CH}_3$  et  $\text{---O-CH}_3$

20 Une famille préférée de composés selon l'invention est représentée par la formule générale :



dans laquelle :



- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = -H, -CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-, CH<sub>3</sub>-O-, Cl-, -CF<sub>3</sub>

5 - R<sub>3</sub> = un radical d'acide aminé hydrolysable par une carboxypeptidase A.

- R<sub>4</sub> = un radical d'acide aminé basique.

R<sub>3</sub> représente préférentiellement la phenylalanine, et,

10

R<sub>4</sub> représente préférentiellement l'arginine ou la lysine.

R<sub>1</sub> est de préférence choisi parmi :

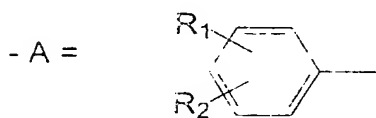
15 -H et -CH<sub>3</sub>, et,

R<sub>2</sub> de préférence choisi parmi :

-CH<sub>3</sub> et -O-CH<sub>3</sub>

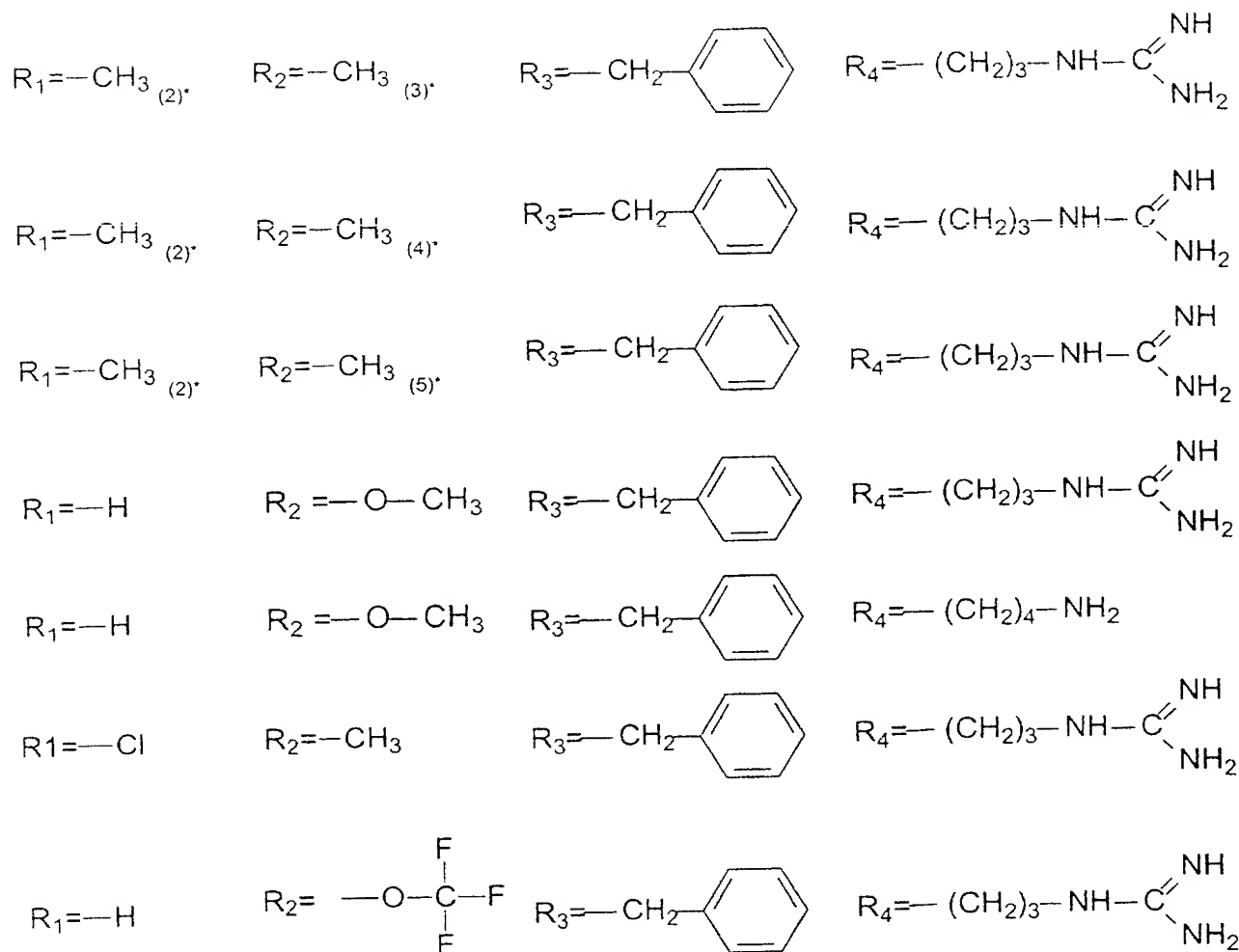
20

Un composé particulièrement préféré de la famille de la présente invention est un composé de formule (i) dans laquelle :



25

ledit composé étant choisi au sein du groupe constitué par les composés suivants, dans lesquels :



\* les chiffres entre parenthèses déterminant la position des groupements methyl sur le radical phényl.

L'invention concerne en particulier, dans le cadre des définitions données ci-dessus, chaque composé répondant à la formule (I) et résultant des combinaisons possibles des groupements A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> dont il a été donné une définition préférée ci-dessus.

10 Dans ce qui suit, les composés ainsi définis seront indifféremment dénommés "composés de formule (I)" ou "substrats de formule (I)".



Selon un deuxième aspect, la présente invention a pour objet une méthode de dosage colorimétrique de l'activité d'une carboxypeptidase N, ou de préférence de l'activité d'une CPU, dans un échantillon biologique dans laquelle :

- 5 - on met en contact ledit échantillon avec un composé chromogène de formule (I) tel que défini ci-dessus, et une enzyme de la famille des carboxypeptidases A, dans des conditions permettant l'hydrolyse de l'échantillon et,
- on détermine l'hydrolyse dudit composé de formule (I) par la CPN ou la CPU de l'échantillon par la mesure de la décroissance de sa coloration (correspondant à une diminution de l'absorption) à une longueur d'onde sélectionnée à partir du spectre d'absorption dudit composé.

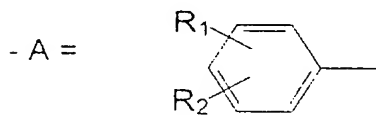
La diminution de la coloration résulte de la double hydrolyse du substrat de formule (I) par les carboxypeptidases N ou U de l'échantillon d'une part, par la carboxypeptidase A d'autre part.

La méthode selon la présente invention est de préférence réalisée à l'aide d'un composé de formule (I) dans lequel l'acide aminé hydrophobe est la phénylalanine, et l'acide aminé basique est l'arginine ou la lysine.

La méthode de l'invention est préférentiellement réalisée à l'aide d'un composé de formule (I) dans laquelle  $R_1$  est choisi parmi  $-H$  et  $-CH_3$  et  $R_2$  parmi  $-CH_3$  et  $-O-CH_3$ .

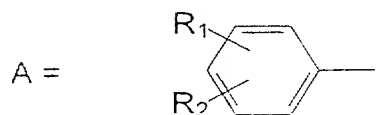
25

La méthode de la présente invention est avantageusement réalisée avec la famille de composés de formule (I) dans laquelle :



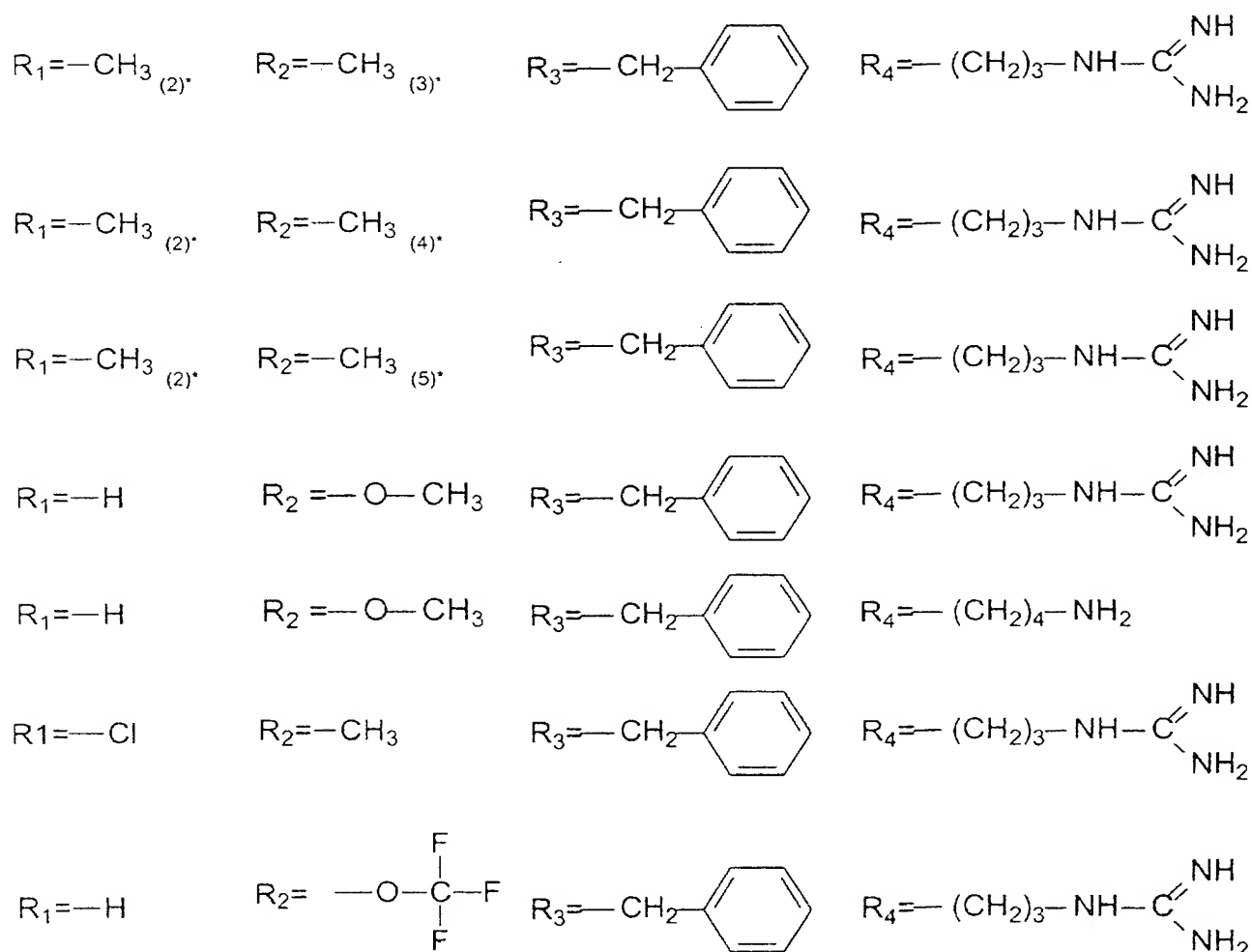
30

Plus particulièrement le composé de formule (I) utilisé est un composé phenylazoformyl dans lequel :



5

ledit composé étant choisi au sein du groupe constitué par les composés suivants, dans lesquels :



Les chiffres entre parenthèses déterminant la position des groupements méthyl sur le radical phényl.

La carboxypeptidase A utilisée peut provenir de différentes sources, telles que, par exemple, le pancréas ou des cellules mastocytaires. Elle peut être d'origine humaine ou animale.

On utilise préférentiellement dans le cadre de l'invention de la carboxypeptidase A pancréatique d'origine bovine.

10

Le principe de la méthode de l'invention est basé sur une hydrolyse d'un substrat coloré de formule (I) tel que décrit ci-dessus, par l'action de la carboxypeptidase N ou de la carboxypeptidase U éventuellement présente dans l'échantillon analysé, associée à celle de la carboxypeptidase A ajoutée dans le milieu. Cette hydrolyse spécifique conduit à une extinction de la coloration du composé de départ, qui peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre.

Plus précisément, compte tenu des spécificités d'hydrolyse des carboxypeptidases N ou U et A exposées précédemment, et des caractéristiques structurales des composés de formule (I) décrits ci-dessus, la mise en contact d'une carboxypeptidase A et d'une carboxypeptidase N ou U avec un tel composé va générer une coupure au niveau de la liaison entre le premier et le second acide aminé dudit composé du fait de l'action de la carboxypeptidase N ou U, suivie quasi simultanément d'une coupure au niveau de la liaison entre le groupement azoformyl et le premier acide aminé, du fait de l'action de la carboxypeptidase A.

La résultante de ces deux réactions sera une décoloration du milieu de départ. Il sera alors aisé de suivre en fonction du temps cette décroissance de coloration en se plaçant à une longueur d'onde d'absorption du colorant [composé formule (I)], de préférence à la longueur d'onde correspondant à son pic d'absorption.

Cette décroissance est représentative de la cinétique d'hydrolyse. La quantité de carboxypeptidase N ou U active présente initialement dans l'échantillon est calculée en comparant la densité optique mesurée à celle d'une courbe d'étalonnage établie à partir d'une gamme de concentrations de carboxypeptidase

5 N ou U purifiée active en solution.

Inversement, si l'échantillon ne contient pas de carboxypeptidase N ou U ou si celle-ci est inactive, il n'y aura pas de coupure entre le premier et second acide aminé du composé de formule (I), et donc, la carboxypeptidase A ne pourra pas

10 agir au niveau de la liaison du groupement coloré sur le premier acide aminé. De ce fait, on n'observera pas de diminution de la coloration de la solution de départ.

L'invention vise plus particulièrement une méthode de dosage de l'activité d'une CPN ou une CPU dans un échantillon sanguin tel que du sang total ou du plasma

15 pur ou dilué, et, préférentiellement, une méthode de dosage de l'activité du TAFI dans un échantillon sanguin, notamment du plasma pur ou dilué.

Dans ce cas, l'échantillon à tester est d'abord mis en présence d'une solution tampon avec, si nécessaire, un activateur de la carboxypeptidase dont on

20 souhaite mesurer l'activité (solution nommée tampon activateur ci-après), et laissé en incubation, le temps nécessaire pour obtenir l'activation de la carboxypeptidase étudiée. L'incubation est de préférence réalisée à température ambiante pendant environ 8 à 12 minutes, de préférence 10 minutes.

25 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'activateur de carboxypeptidase peut être un activateur de la coagulation, que l'on laisse agir de façon à activer la carboxypeptidase U, en particulier le TAFI.

Dans ce cas, on ajoute ensuite dans le mélange un inhibiteur des sérine protéases

30 pour aboutir à un blocage du processus de coagulation. L'inhibiteur de sérine protéases est par exemple le PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-chlorométhylkétone – Bachem – Réf. N.1065) utilisé dans une gamme de concentration finale de 10 à

200  $\mu\text{M}$  et de préférence 150  $\mu\text{M}$ . D'autres composés, tels que le Péfabloc [4-(2-aminoethyl)-benzènesulfonylfluoridehypochloride – Penthapharm - Réf. 399.01] utilisé préféren-tiellement à une concentration de 0,1 mM conviennent également.

- 5 Simultanément ou immédiatement après l'addition de l'inhibiteur, on ajoute l'un des composés de formule (I) selon l'invention en solution aqueuse. Ce composé est en général utilisé dans une gamme de concentrations finales comprise entre 2,5 et 10 mM. Il est de préférence utilisé à 5 mM.
- 10 Après une nouvelle phase d'incubation, de préférence à température ambiante, durant laquelle le substrat de formule (I) aura été coupé au niveau de son second acide aminé par la CPN ou CPU de l'échantillon dont on recherche l'activité, l'hydrolyse est arrêtée par addition d'HCl, suivie immédiatement par l'ajout d'une base pour réajuster le pH à une valeur comprise entre 7 et 8.

15

La densité optique du mélange ainsi obtenu est alors mesurée une première fois sans addition de CPA dans le milieu. La CPA est ensuite ajoutée dans le milieu, et la DO est à nouveau mesurée. Sa décroissance peut être suivie au spectrophotomètre. Elle traduit l'hydrolyse du substrat de formule (I) par l'action

20 conjointe de la CPU ou N de l'échantillon et de la CPA.

Les delta DO ( $\Delta$  DO) mesurés sont comparés avec les valeurs portées sur une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'un échantillon déficient en la CPN ou la CPU étudiée, surchargé avec cette enzyme purifiée.

25

Le protocole décrit ci-dessus constitue un mode de réalisation préféré de l'invention. Toutefois, plusieurs variantes de celui-ci sont envisageables, tant en ce qui concerne les séquences d'addition des différents composés utilisés, que la nature de ces composés. Elles entrent également dans la définition de la présente

30 invention.



Ainsi, il est par exemple possible d'incorporer le substrat de formule (I) dès le début de la méthode, en même temps que le tampon activateur de la coagulation.

Dans le cas où le tampon activateur active la coagulation, l'activation peut être  
5 réalisée selon différentes voies connues de l'homme du métier, et utilisées en routine dans les tests de coagulation.

Ces voies d'activation sont notamment :

- 10 - la voie d'activation par le complexe thrombine/thrombomoduline. Cette première possibilité constitue un mode de réalisation préféré de la présente invention.
- la voie d'activation par le facteur XI activé, qui dans ce cas remplace la thrombine dans le tampon activateur. Pour accélérer la réaction, il peut être  
15 avantageux de rajouter également de la thrombomoduline dans le milieu.
- la voie d'activation par des venins, notamment des venins de serpent, avec également l'ajout éventuel de prothrombine dans le milieu. Les venins préférentiellement utilisés sont les venins de la famille des "thrombin-like" tels  
20 que le venin d'*Arkistrodon rhodostoma* ou *Bathrops atrox*, ainsi que les venins d'activateurs de prothrombine, tels que celui de *Notechis scutatus* ou d'*Echis carinatus* (15 - 18 ).
- la voie d'activation par le facteur tissulaire, en présence de phospholipides et de  
25 calcium (activation de la voie exogène selon le principe d'un temps de Quick),
- la voie d'activation par la plasmine.

Avantageusement, la méthode selon l'invention permet de mesurer pour un même  
30 échantillon, d'une part l'activité de la CPN et/ou de la CPU "constitutionnelle" présente dans celui-ci, i.e. la CPN et/ou CPU présente sous une forme active "naturellement" (i.e. sans induction de l'activation par un tampon activateur), et

d'autre part, l'activité de la CPN et/ou CPU activable, i.e. la CPN et/ou la CPU présente dans l'échantillon sous une forme inactive, dont l'activité sera induite ou générée durant le processus d'activation lié à l'effet du tampon activateur.

- 5 Pour cela, on compare l'activité d'hydrolyse sur un substrat de formule (I) d'un échantillon selon la méthode décrite ci-dessus, en mettant l'échantillon soit en présence de tampon activateur (détection de l'activité totale de la CPN ou la CPU dans l'échantillon), soit en présence d'un tampon physiologique sans activateur (détection de l'activité de la CPN et/ou la CPU constitutionnelle).

10

La différence de delta de DO entre les deux mesures permet d'obtenir l'activité de la CPN ou de la CPU activable présente dans l'échantillon.

- 15 Selon une variante préférée, la présente invention a pour objet une méthode de dosage du TAFI activé dans un échantillon sanguin, ladite méthode utilisant l'un des composés ou substrats de formule (I) décrits précédemment.

- 20 L'activité du TAFI constitutionnel et/ou activable est mesurée en traitant l'échantillon tel que cela vient d'être décrit, en présence et en absence d'un inhibiteur spécifique du TAFI.

- 25 L'inhibiteur qui est de préférence utilisé est le CPI ("Carboxypeptidase Inhibitor from Potato Tubers) dont l'utilisation dans des études *in vitro* et *in vivo* sur la fonction du TAFI a été largement décrite dans la littérature (Réf. 1). Il est aujourd'hui bien connu de l'homme du métier que le CPI inhibe spécifiquement le TAFI sans altérer l'activité d'autres CP plasmatiques. Dans le cadre de la méthode de l'invention, le CPI peut être utilisé dans une gamme de concentrations allant de 0,10 à 0,50 mM. Il est de préférence utilisé à 0,38 mM.

- 30 Selon le principe de cette variante préférée, l'échantillon est activé par le tampon d'activation, par exemple un tampon d'activation de la coagulation par le complexe

thrombine/thrombomoduline, et traité selon la méthode décrite précédemment soit en présence soit en l'absence d'inhibiteur du TAFI.

La différence de coloration du milieu avec et sans inhibiteur du TAFI permet ainsi  
5 de déterminer l'activité enzymatique propre au TAFI activé (TAFIa) dans l'échantillon.

Plus précisément, la méthode de l'invention peut être réalisée selon le protocole suivant : l'échantillon à tester est divisé en 2 aliquotes ou plus si nécessaire, selon  
10 que l'on souhaite déterminer l'activité de tout le TAFI contenu dans l'échantillon ou que l'on souhaite faire la distinction entre l'activité du TAFI constitutionnel et celle du TAFI activable.

- Un premier aliquote contenant l'inhibiteur du TAFI est activé et traité selon la  
15 méthode décrite précédemment. Celui-ci ne va donc générer qu'une faible décoloration du milieu, résultant d'une hydrolyse résiduelle du substrat de formule (I) par d'autres carboxypeptidases présentes dans l'échantillon.
- Un second aliquote est traité de manière identique au précédent, mais en  
20 l'absence d'inhibiteur du TAFI. Il va en résulter une forte décoloration du milieu, liée à l'activité d'hydrolyse du substrat de formule (I) par le TAFI activé dans l'échantillon.
- On mesure la différence de coloration ( $\Delta DO$ ) entre le premier et le second  
25 aliquote.  
Celle-ci est ainsi représentative de l'activité spécifique du TAFI activé dans l'échantillon.

Si l'on souhaite faire la distinction entre l'activité spécifique du TAFI activable et  
30 celle du TAFI constitutionnel, on utilise un troisième aliquote du même échantillon dont on mesure également l'activité d'hydrolyse sur le substrat de formule (I), mais



dans lequel on n'aura pas déclenché l'activation, en n'ajoutant pas de tampon activateur dans le milieu.

Les  $\Delta$  DO entre ces différents aliquotes permettent d'obtenir soit l'activité du TAFI total de l'échantillon, soit celle du seul TAFI constitutionnel, et donc d'en déduire celle du TAFI activable.

Selon un troisième aspect, l'invention a pour objet un kit de diagnostic pour le dosage d'une CPN ou une CPU, ledit kit de diagnostic comprenant un substrat de formule (I) tel que défini précédemment.

Préférentiellement, le kit de diagnostic selon la présente invention est un kit pour mesurer l'activité du TAFI dans un échantillon sanguin.

Un tel kit de diagnostic comprend notamment :

- un activateur du TAFI,
- de la carboxypeptidase A,
- un substrat de formule (I),
- un inhibiteur du TAFI,
- un inhibiteur des serine protéases.

Chacun de ces composants se présentent préférentiellement en poudre ou sous forme lyophilisée.

Les exemples ci-après et les figures illustrent la présente invention.

Figure 1 : Spectre d'absorption des différents composés de formule (I) synthétisés, mesuré avec un spectrophotomètre UV-visible.

Figure 2 : Analyse du AAFRR effectuée par hydrolyse acide.



Figure 3 : Courbe d'étalonnage établie à partir d'un plasma déficient en TAFI, surchargé avec du TAFI purifié pour obtenir une gamme de concentration allant de 0 à 26 µg/ml.

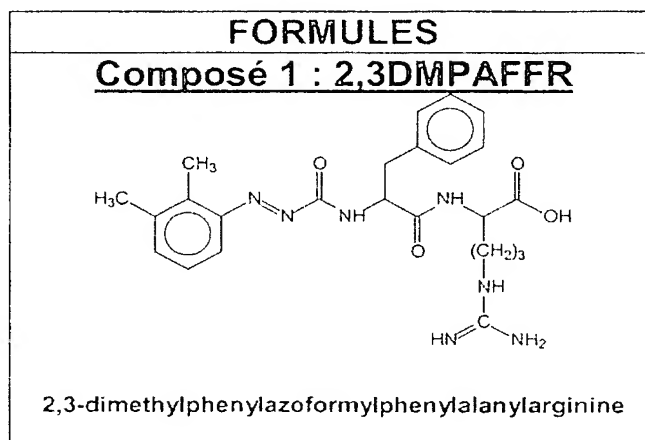
5 **EXEMPLE N° 1** :

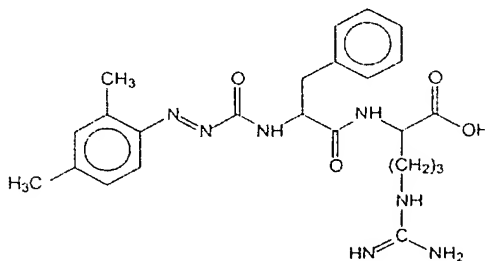
Synthèse d'un groupe de composés azolformyl selon l'invention.

10 Le tableau I ci-après indique les formules chimiques de 5 des composés préférés parmi les composés de formule (I) selon l'invention. Leurs spectres d'absorption mesurés avec un spectrophotomètre UV-visible (UVIKON-KONTRON) sont reportés sur la figure 1.

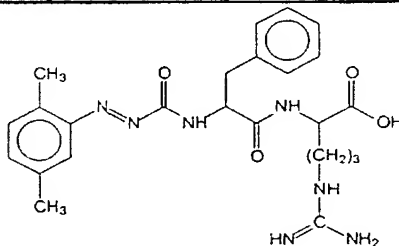
15 On décrit ci-après en détail la synthèse de l'un d'eux, le composé n° 4 (MxPAFFR). Les étapes décrites ci-dessous pour ce composé sont identiques pour chacun des autres, excepté pour le composé n° 5 (MxPAFFK) pour lequel une étape supplémentaire de déprotection de la lysine est nécessaire (voir schéma réactionnel et explications ci-après).

20 **TABLEAU 1** :

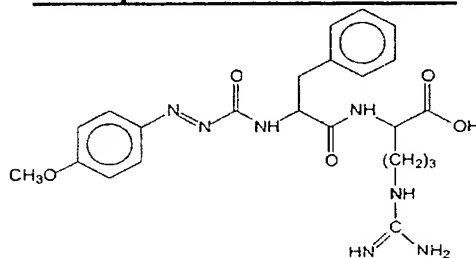


**Composé 2 : 2,4 DMPAFFR**

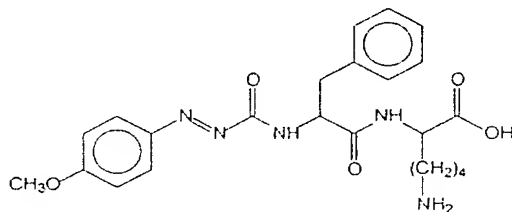
2,4-dimethylphenylazoformylphenylalanylarginine

**Composé 3 : 2,5 DMPAFFR**

2,5-dimethylphenylazoformylphenylalanylarginine

**Composé 4 : MxPAFFR**

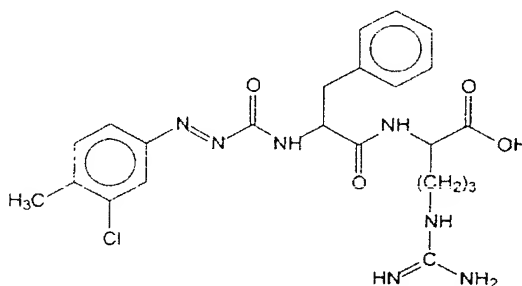
4-methoxyphenylazoformylphenylalanylarginine

**Composé 5 : MxPAFFK**

4-methoxyphenylazoformylphenylalanyllysine

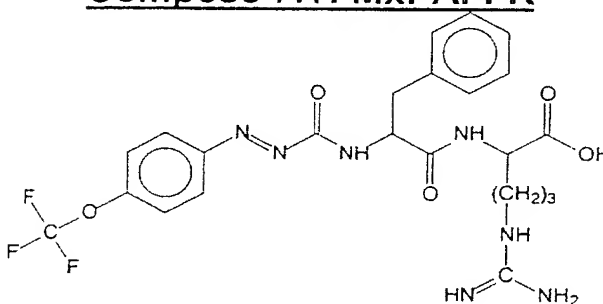


### Composé 6 : CITAFFR



3-chloro-p-tolylazoformylphenylalanylarginine

### Composé 7:TFMxPAFFR



4-(trifluoromethoxy)azoformylphenylalanylarginine

### A/ Synthèse du 4-methoxyphenylazoformylphenylalanylarginine (Composé 4)

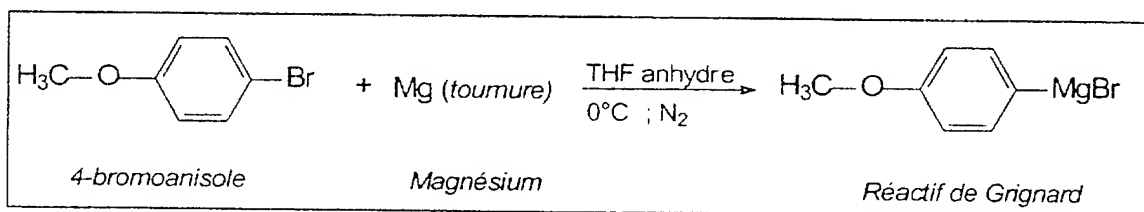
5

**Introduction :** Toutes les étapes décrites ci-dessous sont identiques pour chaque colorant. Chaque étape est suivie par Chromatographie Liquide Haute Performance et par Analyse d'Acides Aminés pour les couplage avec la Phenylalanine et l'Arginine.

10

#### 1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard

#### Schéma réactionnel



Mode opératoire : Préparer 1 éq. de 4-bromoanisole et 1 éq. de magnésium. Introduire le magnésium et 20 % en masse du 4- bromoanisole dans un tricol, reprendre dans du tétrahydrofurane anhydre (2mL/mmol) et placer le montage sous azote. Initier la réaction en chauffant le tricol en un point avec un décapeur thermique, le milieu réactionnel devient marron. Quand la réaction démarre (effervescence à la surface du magnésium). Placer à reflux à 90 °C puis additionner lentement le reste du 4-bromoanisole repris dans du THF anhydre (2mL/mmol). Arrêter le reflux après 1h. Le bromure de 4-methoxyphenylmagnesium est utilisé tel quel pour l'étape suivante (couleur marron).

Remarque : La verrerie et le magnésium sont préalablement séchés à l'étuve à 120 °C et les autres produits au dessiccateur.

Temps de rétention : Le réactif de Grignard étant un composé très instable et sensible à l'eau, on obtient donc trois temps de rétention caractéristiques des produits de dégradation formés lors de l'analyse HPLC :

20

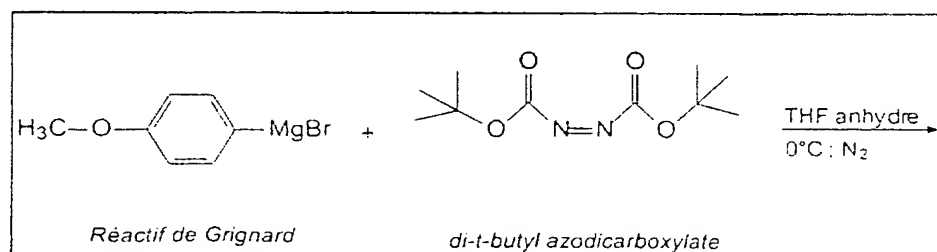
Temps de rétention 1 : 2.68 min

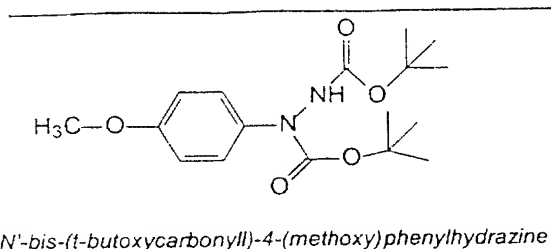
Temps de rétention 2 : 3.32 min

Temps de rétention 3 : 5.38 min

25 2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-t-butylazodicarboxylate

Schéma réactionnel





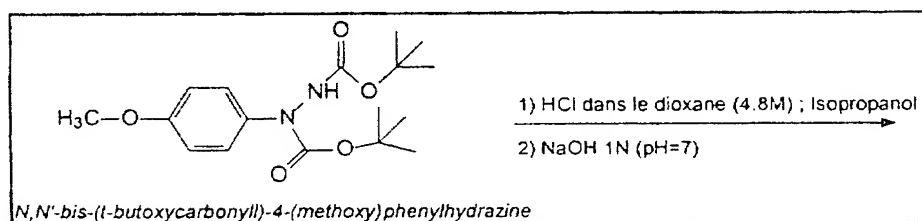
5

Mode opératoire : Reprendre à part 1 eq. de di-t-butylazodicarboxylate et 1 eq. de 4-methoxyphenylmagnesiumbromide (réactif de Grignard) dans du THF anhydre (2 mL/mmol). Refroidir chacun entre 0-5°C. Additionner le réactif de Grignard sur le di-t-butylazodicarboxylate. Agiter 10 min, ajouter 1.02 eq. d'acide acétique puis  
 10 laisser revenir à température ambiante. Effectuer une extraction eau/éther. Sécher la phase étherée, évaporer à sec. On obtient une huile jaune.  
 Temps de rétention : 7.85 min

### 3<sup>ème</sup> étape : Déprotection

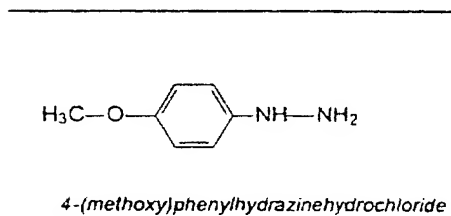
15

#### Schéma réactionnel



20

25



30

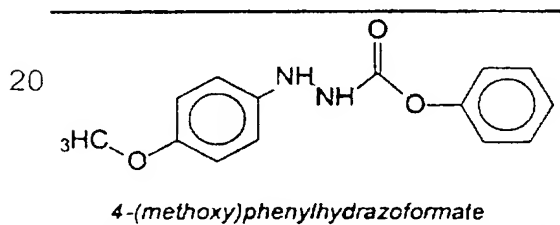
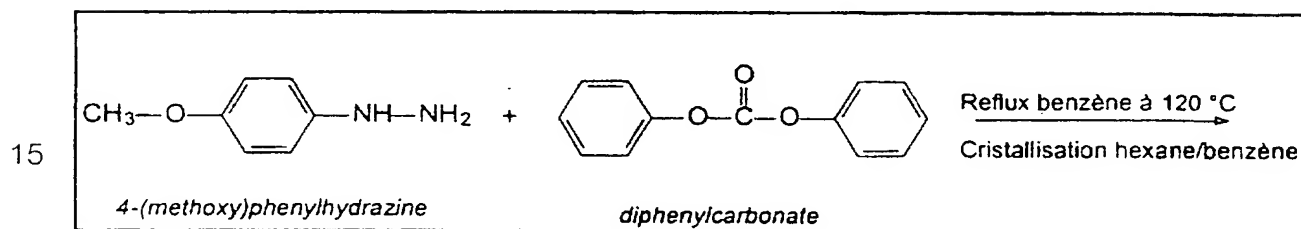
35

Mode opératoire : Reprendre 1 eq. de N, N'-bis-(t-butoxycarbonyl)-4-(methoxy)phenylhydrazine dans de l'isopropanol (10.2mL/mmol) puis ajouter du HCl dans le dioxane à 4.8 M (2mL/mmol). Porter à reflux (80°C). Après 15 min ,

refroidir, ajouter de l'ether (5mL/mmol). La 4-methoxyphenylhydrazinehydrochloride précipite. Filtrer et sécher. Reprendre la poudre dans de l'eau puis amener à pH 7. Effectuer une extraction eau / dichloromethane et évaporer la phase dichloromethane à sec. On obtient la 4-methoxyphenylhydrazine (poudre jaune) qui est séchée.  
 Temps de rétention : 2.20 min

#### 4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonate

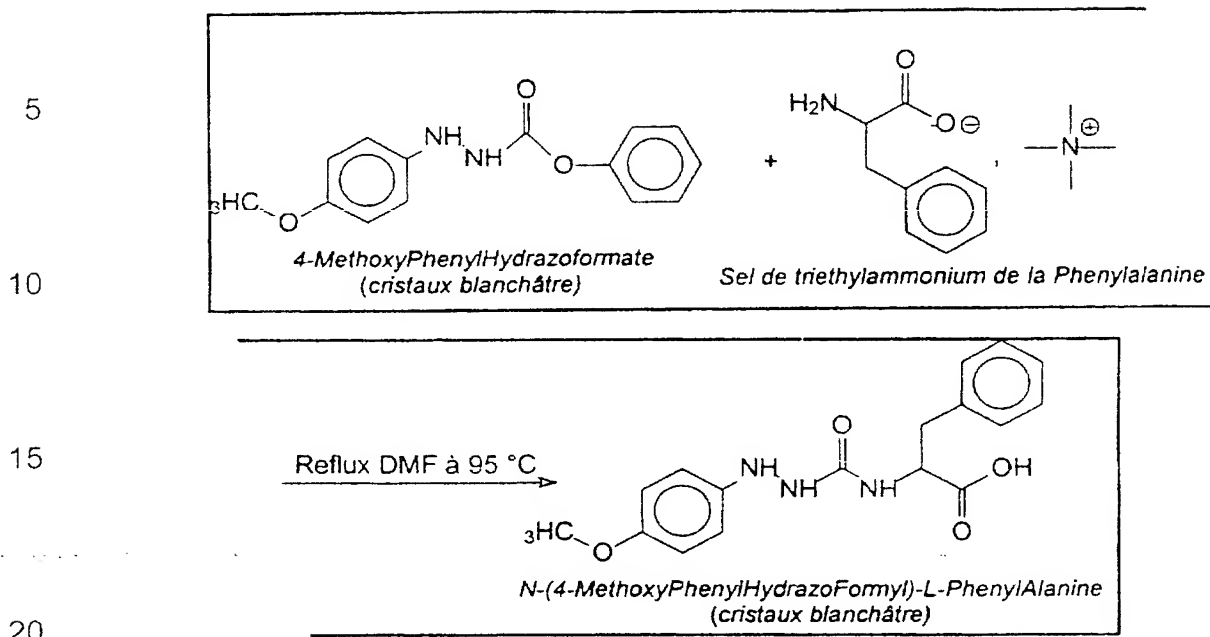
##### 10 Schéma réactionnel



25

Mode opératoire : Reprendre 1.4 eq. de diphenylcarbonate dans du benzène (0.25 mL/mmol) et porter à reflux à 120 °C. Additionner lentement 1eq. de 4-methoxyphenylhydrazine repris dans du benzène (0.7 mL/mmol). Arrêter le reflux après 6h. Concentrer le milieu réactionnel puis effectuer une cristallisation hexane/benzène (4/1). Filtrer et sécher les cristaux blanchâtres au dessiccateur.  
 Temps de rétention : 6.74 min

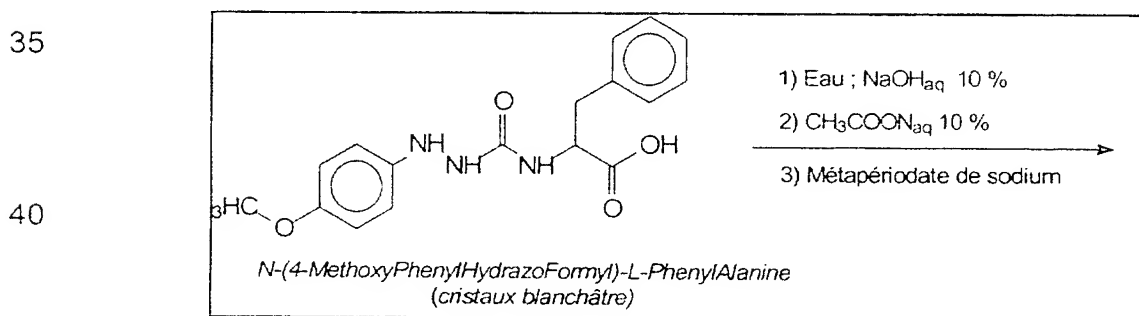
#### 5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine

Schéma réactionnel

Mode opératoire : Porter à reflux (95°C) 1.2 eq. de sel de triethylammonium de la phenylalanine repris dans de la diméthylformamide (3.33mL/mmol). Additionner  
25 lentement 1 éq. de 4-methoxyphenylhydrazoformate repris dans de la diméthylformamide (2mL/mmol). Arrêter le reflux après 1h30, laisser revenir à température ambiante, concentrer. Acidifier (pH =2). Purifier par chromatographie (cristaux blanchâtre).

Temps de rétention : 6.12 min

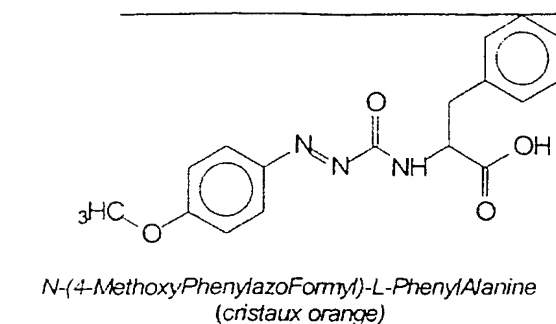
30 **6<sup>ème</sup> étape : Oxydation ; Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"**

Schéma réactionnel



5

10



Mode opératoire : Reprendre 1 éq. de *N*-(4-methoxyphenylhydrazoformyl)-L-Phenylalanine dans de l'eau ultra-pure (20.8 mL/mmol) contenant 1 éq. d'hydroxyde de sodium et 1 éq. d'acétate d'ammonium. Additionner 1 éq. de metaperiodate de sodium repris dans de l'eau ultra-pure (4.2 mL/mmol). Après 20 min le milieu réactionnel est acidifié (pH=2) puis purifié par chromatographie (cristaux orange).

Temps de rétention : 6.86 min

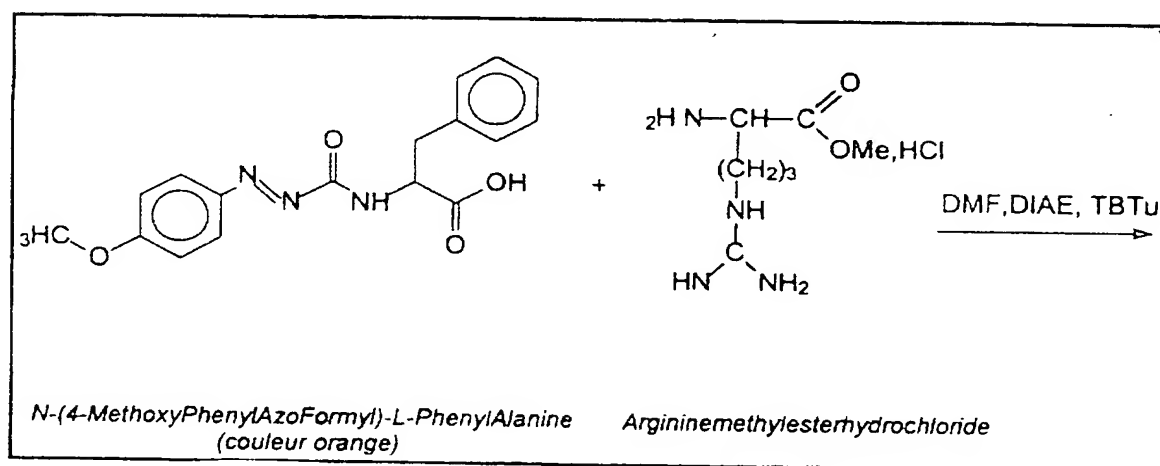
## 20 7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec l'Arginine

### Schéma réactionnel

25

30

35



40

5

10

*N*-(4-MethoxyPhenylAzoFormyl)-L-PhenylAlanylArginineMethylester  
(couleur orange)

15

Mode opératoire : Reprendre 1 éq. d'Argininemethylester,hydrochloride dans de la dimethylformamide (3mL/mmol). Ajouter 1.1 éq. de DIAE (Diisopropylethylamine), 1éq. de N-(4-methoxyphenylazoformyl)-L-Phenylalanine puis 1.1 éq. de TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate). Ajouter la

20 quantité nécessaire de DIAE pour avoir un pH à 7-8. Après 5 min, évaporer à sec et purifier par chromatographie (cristaux orange).

Temps de rétention : 6.06 min

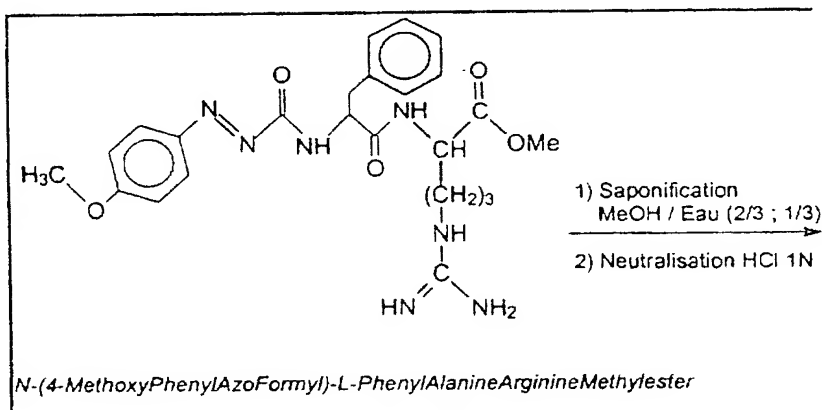
## 25 8<sup>ème</sup> étape : Saponification

### Schéma réactionnel

30

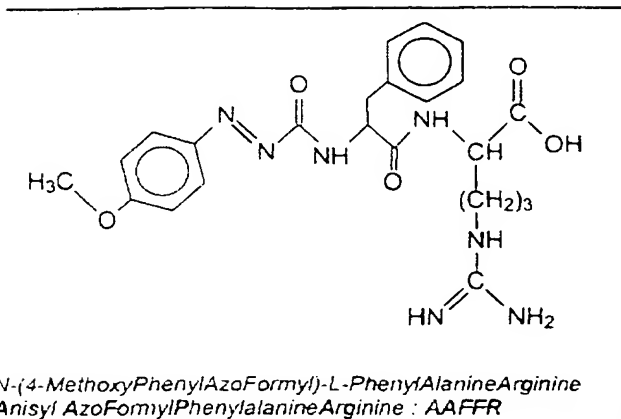
35

40



5

10



Mode opératoire : reprendre 1 éq. de N-(4-methoxyphenylazoformyl)-L-PhenylalanineArgininemethylester dans un mélange eau/méthanol (Ratio : 1/2 ; 3 mL/mmol). Additionner 3 éq. d'hydroxyde de sodium 1N. Après 1 h, acidifier le MR, concentrer puis effectuer une extraction eau/dichloromethane. La phase dichloromethane est évaporée puis séchée. On obtient le N-(4-methoxyphenylazoformyl)-L-PhenylalanylArginine qui est une poudre orange.

Temps de rétention : 5.5 min

20

Une analyse d'acide aminée du produit final est effectuée après hydrolyse acide pour contrôler l'homogénéité de la séquence. Les résultats de cette analyse sont reportés sur le chromatogramme de la figure 2.

### 25 Conditions analytiques :

- Chaîne HPLC AAA ; Dérivatisation précolonne au PITC (phénylisocyanate)
- Colonne C18 ; 100Å ; 5µ ; 250 x 4.6 mm
- Détection à 254 nm ; Débit = 1 mL/min
- Eluants :
  - A : Tampon acétate pH 5.74
  - B: Tampon 70% CH<sub>3</sub>CN, 30% AcONa ; 32mM ; pH = 6.10
  - C : CH<sub>3</sub>CN

35

Les protocoles de synthèse pour les autres composés sont basés sur les mêmes étapes que celles qui viennent d'être décrites ci-dessus. Ceux-ci sont résumés dans les schémas réactionnels ci-après.

5

Les temps de rétention obtenus à chaque étape de synthèse de ces composés sont reportés dans le tableau II ci-dessous :

10

**TABLEAU II : Temps de rétention obtenus sur HPLC à chaque étape pour les autres colorants synthétisés**

Étape	2,3DMPAFFR	2,4DMPAFFR	2,5DMPAFFR	MxAPFFR	MxPAFFK	CITAFFR	TFMxPAFFR
1	/	/	/	/	/	/	/
2	9.12 min	9.18 min	9.15 min	7.85 min	7.85 min	9.25 min	9.26 min
3	3.59 min	3.81 min	3.73 min	2.20 min	2.20 min	3.93 min	3.94 min
4	7.87 min	7.96 min	7.82 min	6.74 min	6.74 min	8.06 min	7.92 min
5	7.04 min	7.13 min	7.11 min	6.12 min	6.12 min	7.51 min	7.45 min
6	7.82 min	7.88 min	7.90 min	6.86 min	6.86 min	7.85 min	7.79 min
7	7.10 min	7.02 min	7.10 min	6.06 min	9.84 min	7.13 min	7.08 min
8	6.55 min	6.54 min	6.62 min	5.50 min	9.23 min	6.71 min	6.65 min

15

**Conditions analytiques :**

- Colonne C18 ; 5 $\mu$  ; 100x4.6mm
- Détection à 254 nm ; Débit = 1 mL/min
- Gradient : 0'  $\rightarrow$  10%B 10'  $\rightarrow$  90%B
- Avec A : Eau à 0.1 % d'acide trifluoroacétique  
B : Acétonitrile à 0.1 % d'acide trifluoroacétique

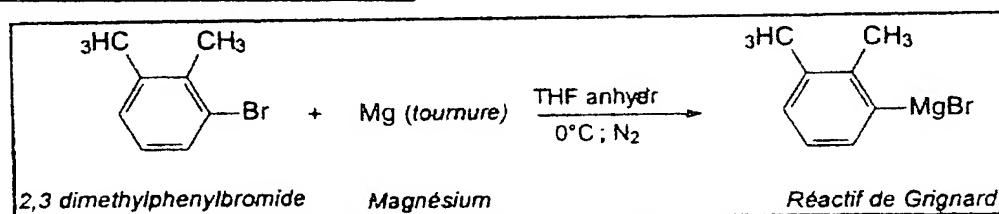
20

**B/ Synthèse du 2,3-dimethylphenylazoformylphenylalanylarginine (Composé 1) :**

25

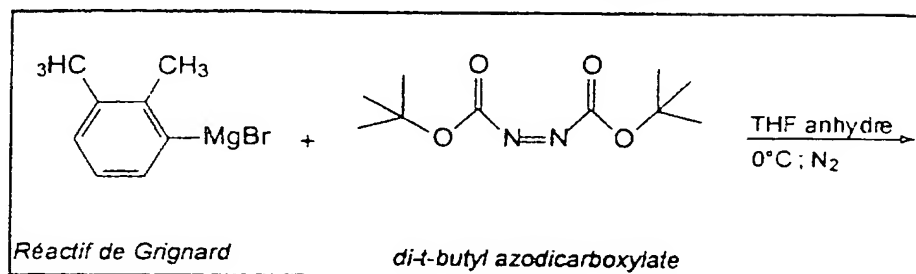
**1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard**

30



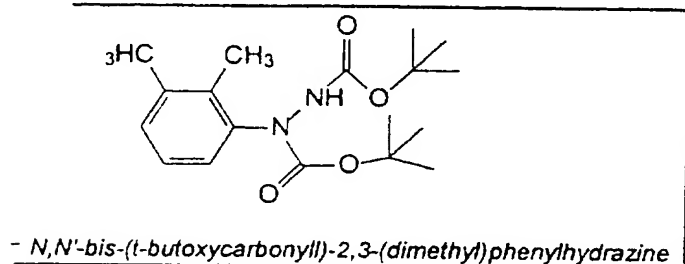
## 2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-t-butylazodicarboxylate

5



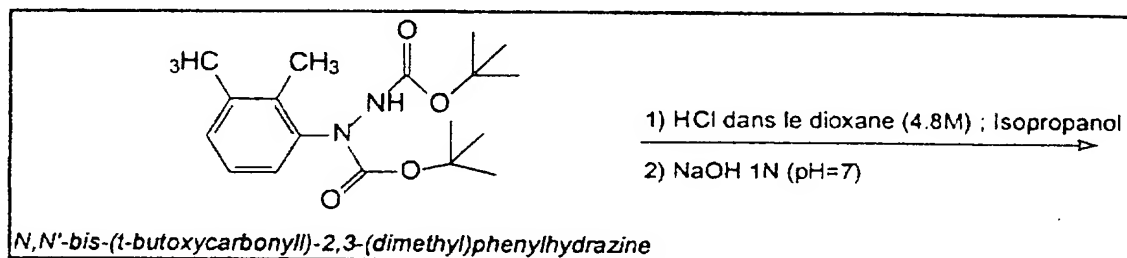
10

15



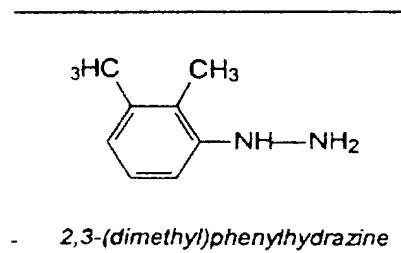
## 3<sup>ème</sup> étape : Déprotection

25



30

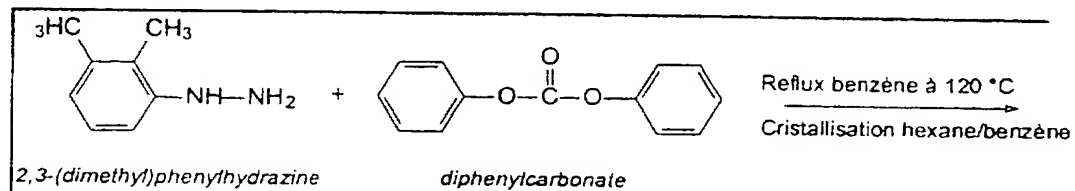
35



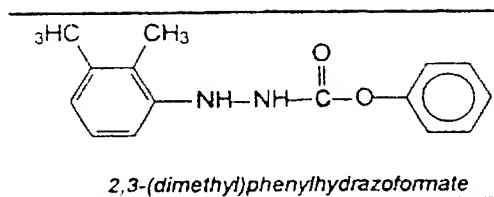
## 4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonate

40

45



5

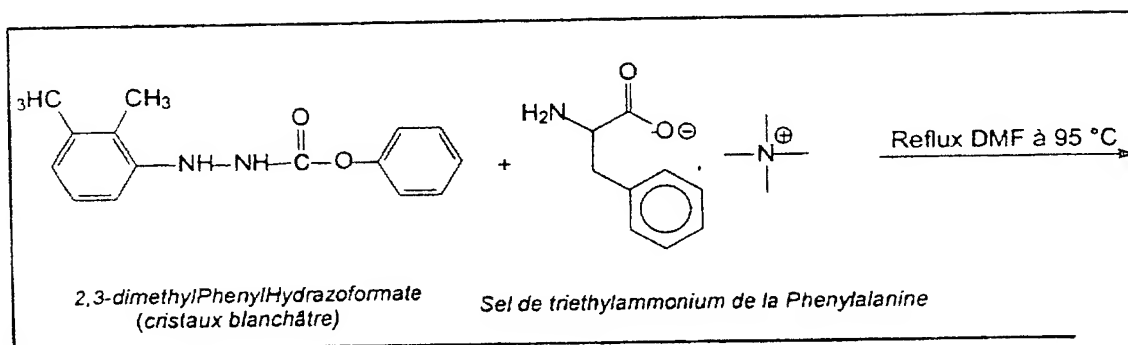


### 5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine

10

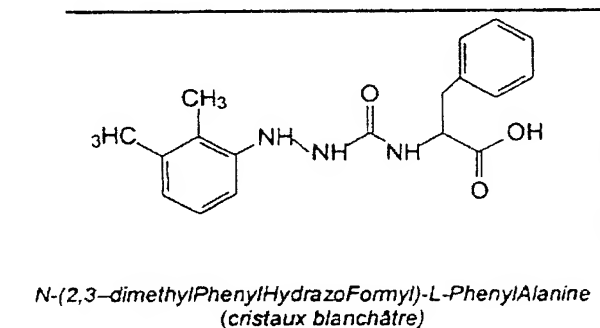
15

20



25

30

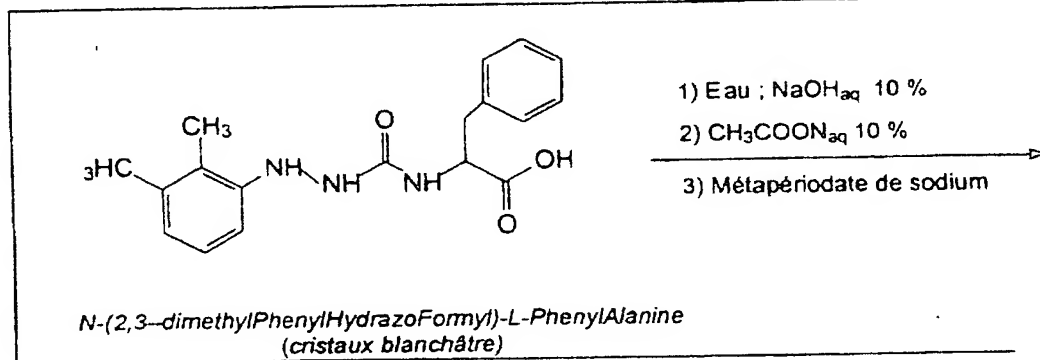


### 6<sup>ème</sup> étape : Oxydation : Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"

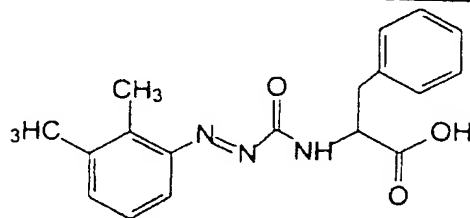
35

40

45



5

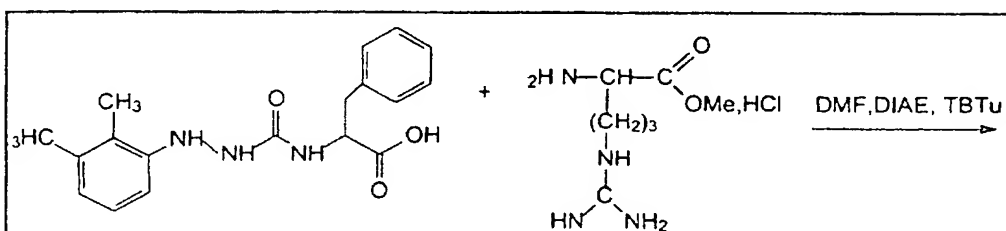


10

*N*-(2,3-dimethylphenylazoformyl)-L-Phenylalanine  
(cristaux orange)

### 7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec l'Arginine

15

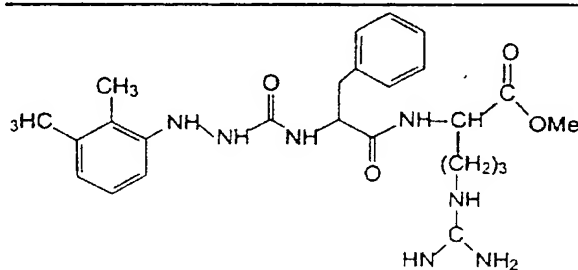


20

*N*-(2,3-dimethylphenylazoformyl)-L-Phenylalanylarginine methyl ester  
(couleur orange)

25

30

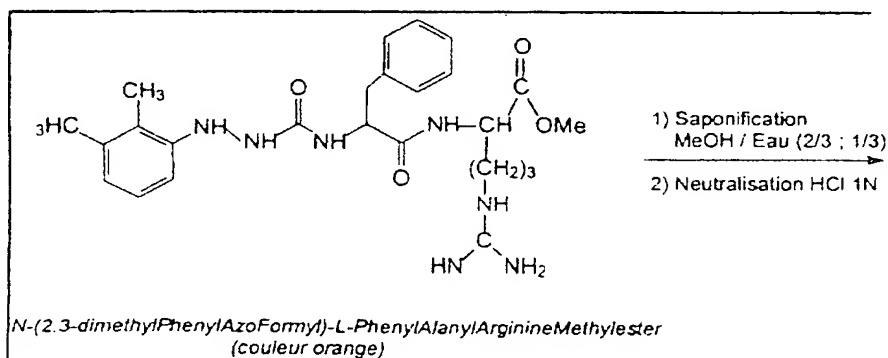


35

*N*-(2,3-dimethylphenylazoformyl)-L-Phenylalanylarginine methyl ester  
(couleur orange)

### 8<sup>ème</sup> étape : Saponification

40

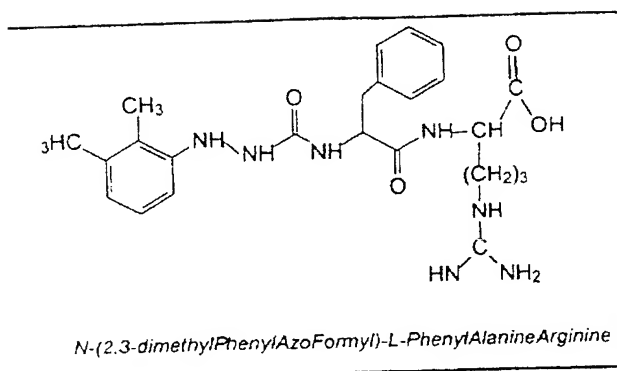


45

*N*-(2,3-dimethylphenylazoformyl)-L-Phenylalanylarginine  
(couleur orange)

5

10

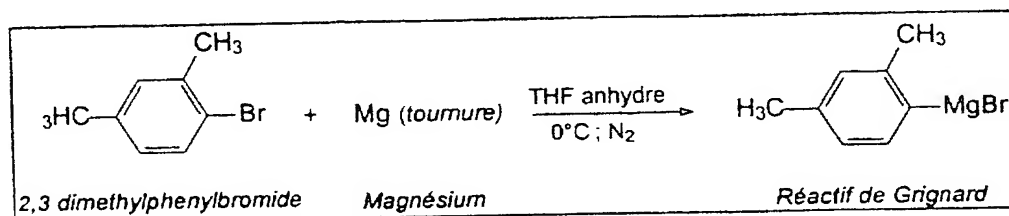


15

C/ Synthèse du 2,4-dimethylphenylazoformylphenylalanylarginine (Composé 2) :

20 1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard

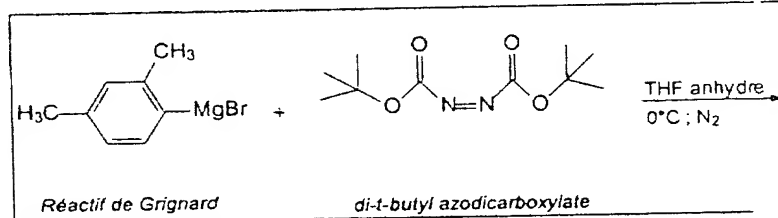
25



30

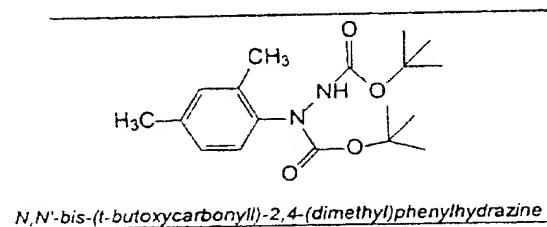
2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-*t*-butylazodicarboxylate

35



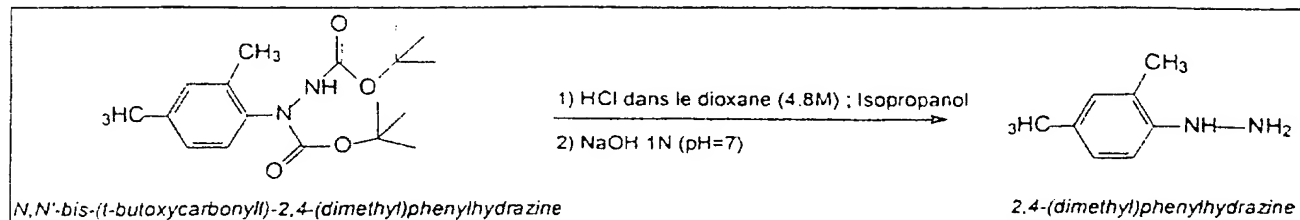
40

45

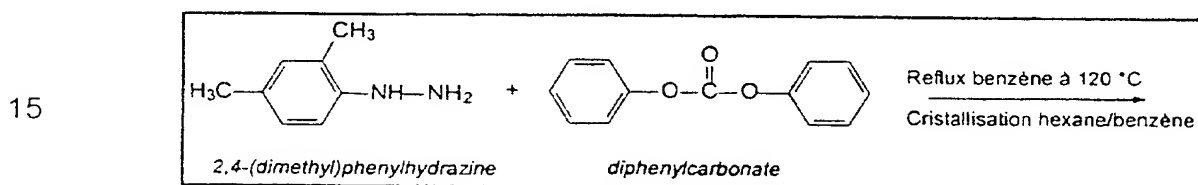


3<sup>ème</sup> étape : Déprotection



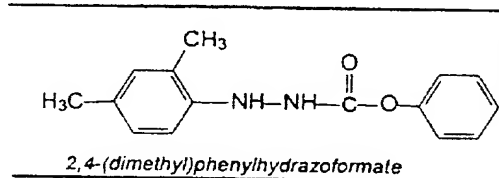


10 4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonate

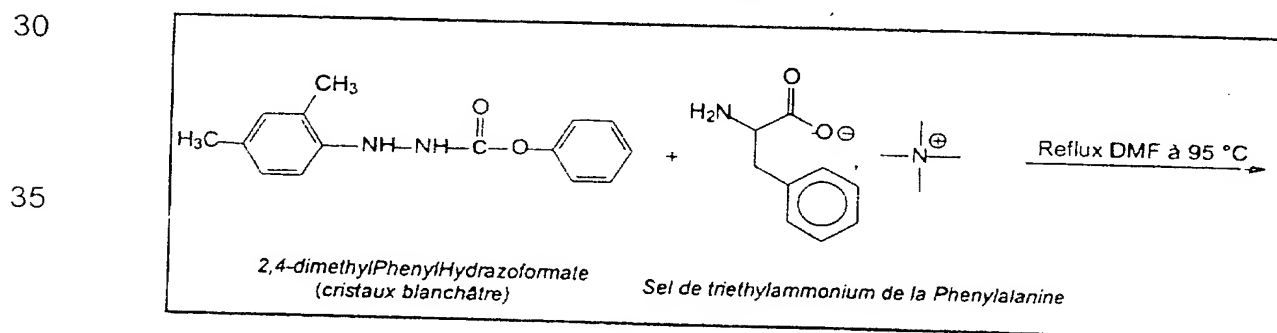


20

25

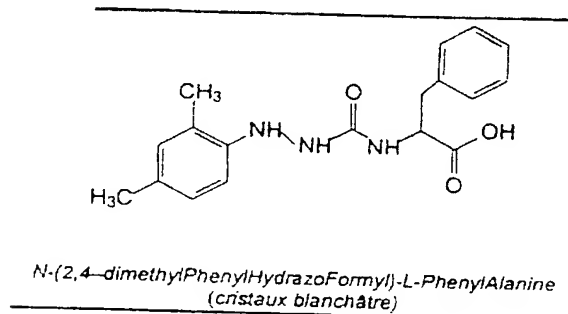


5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine



40

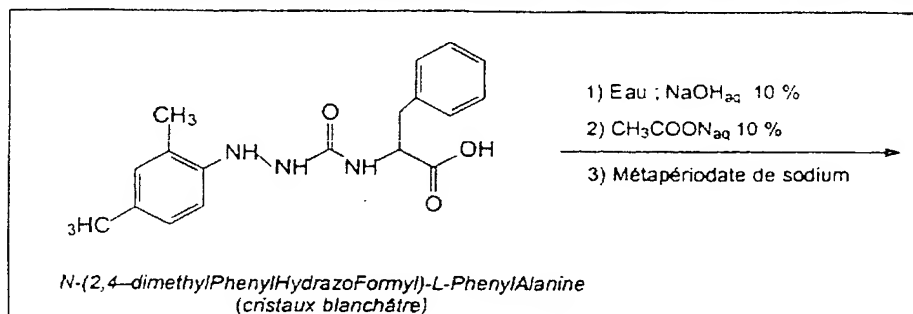
45



6<sup>ème</sup> étape : Oxydation ; Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"

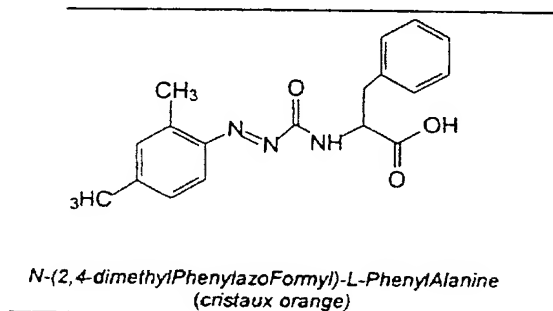
5

10



15

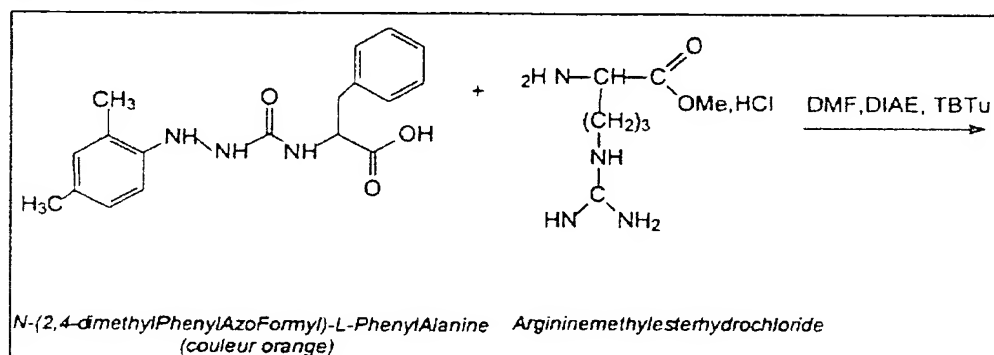
20



25 7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec l'Arginine

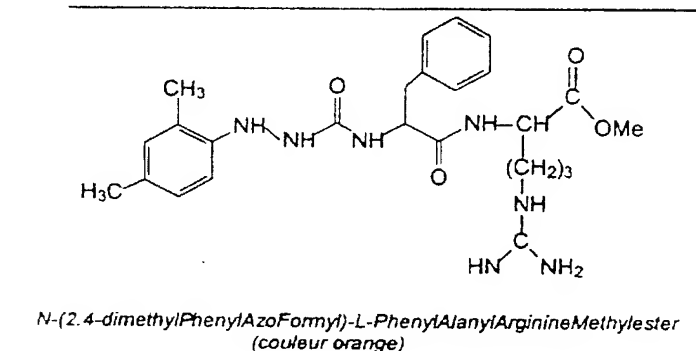
30

35



40

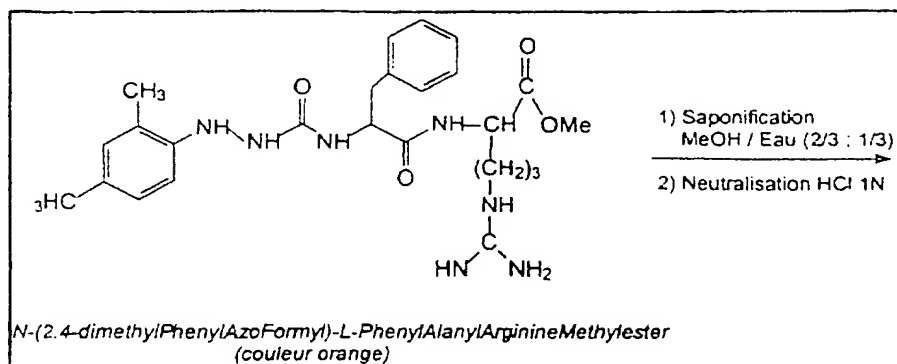
45



8<sup>ème</sup> étape : Saponification

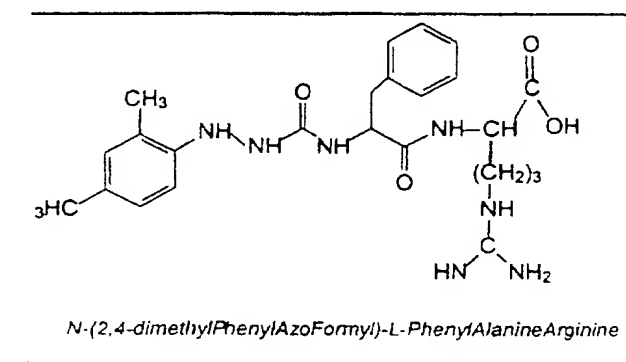
5

10



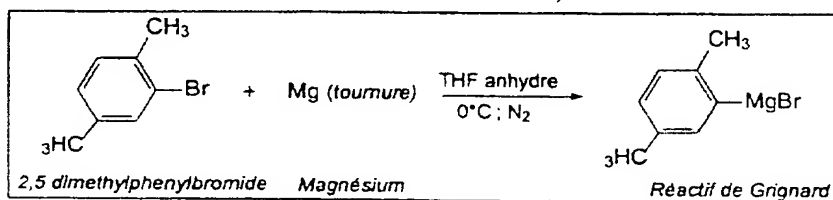
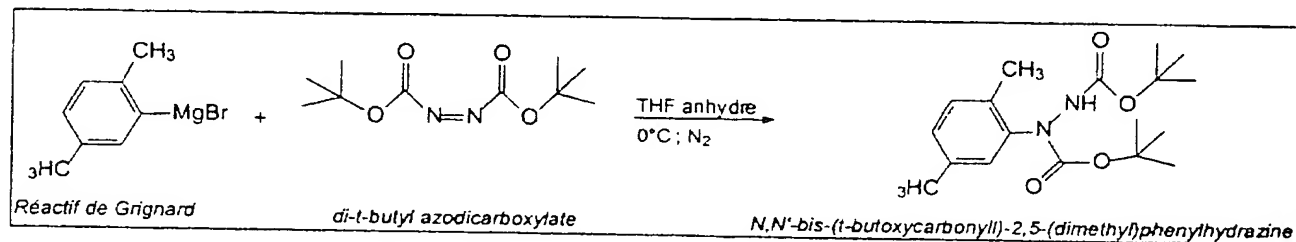
15

20

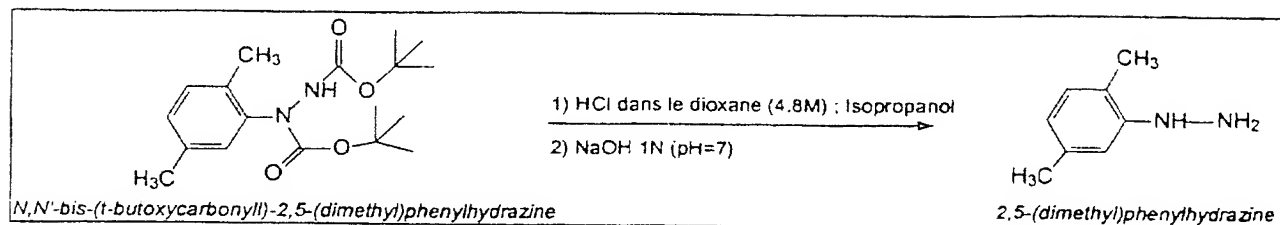
25 D/ Synthèse du 2,5-diméthylphénylazofornylphénylalanine arginine (Composé 3) :1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard

30

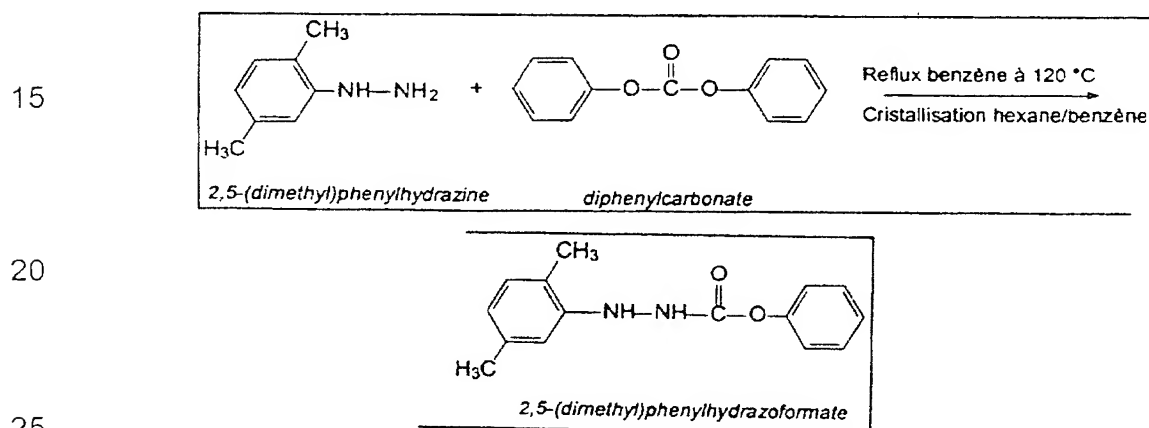
35

2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-*t*-butylazodicarboxylate

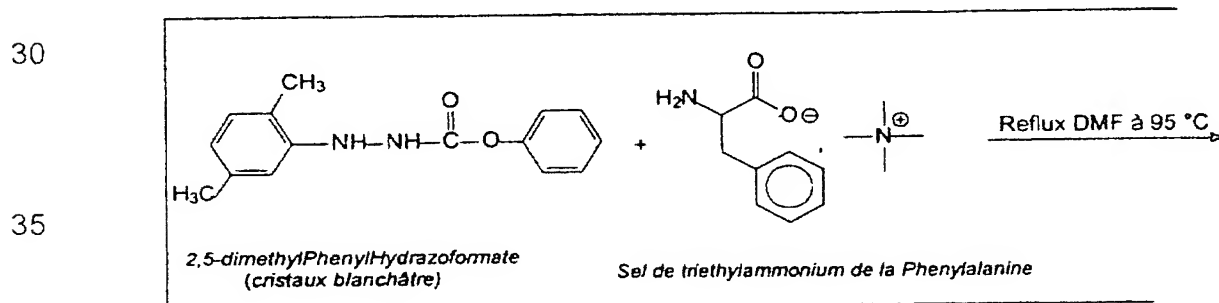
### 3<sup>ème</sup> étape : Déprotection



### 4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonate



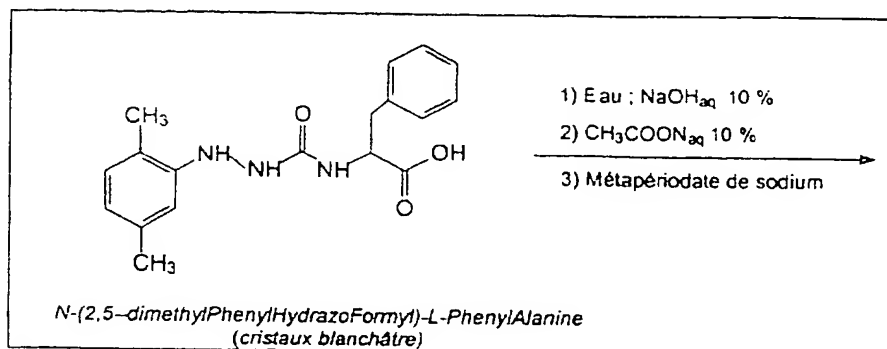
### 5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine



6<sup>ème</sup> étape : Oxydation ; Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"

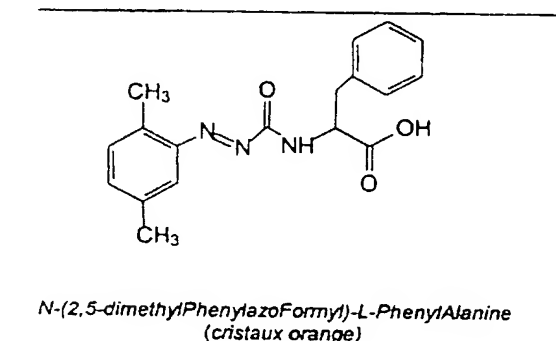
5

10



15

20

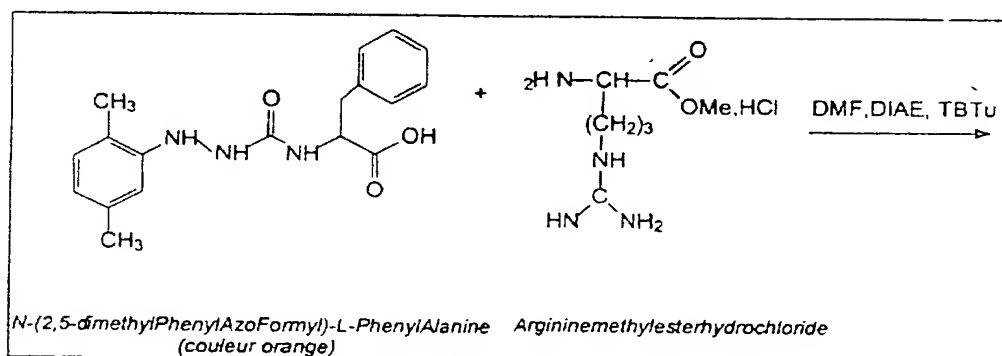


25

7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec l'Arginine

30

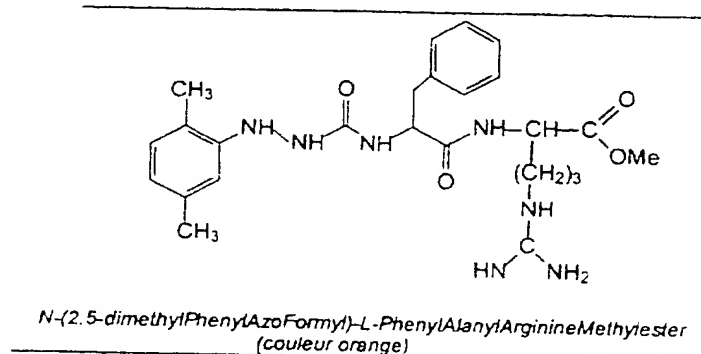
35



40

45

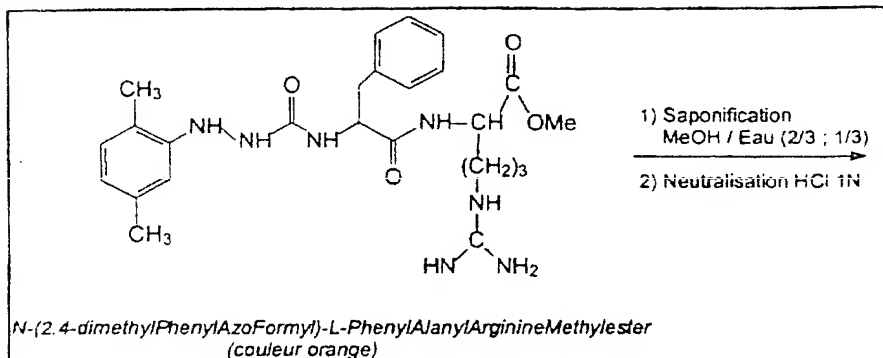
50



### 8<sup>ème</sup> étape : Saponification

5

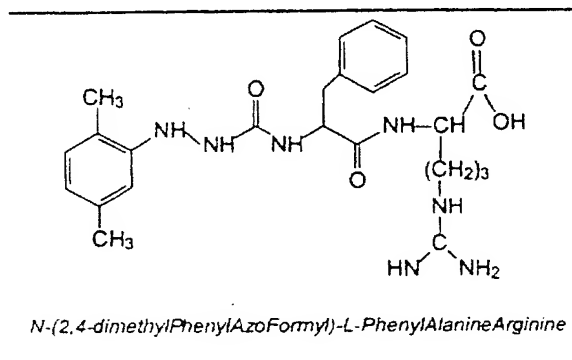
10



15

20

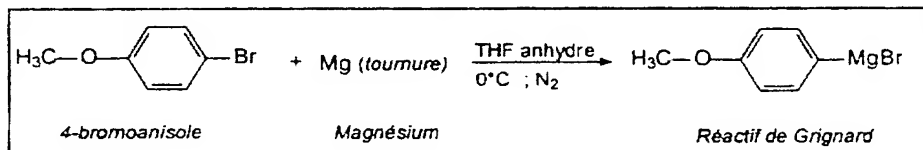
25



### E/ Synthèse du 4-metnoxyphenylazoformylphenylalanyllysine :

#### 1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard

30

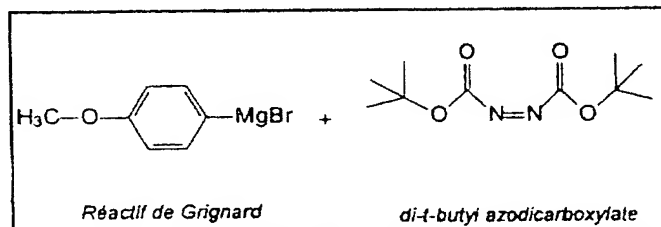


35

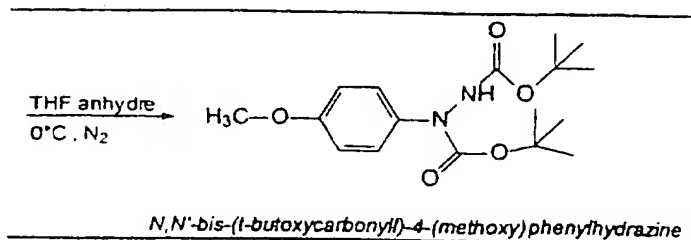
#### 2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-t-butylazodicarboxylate

40

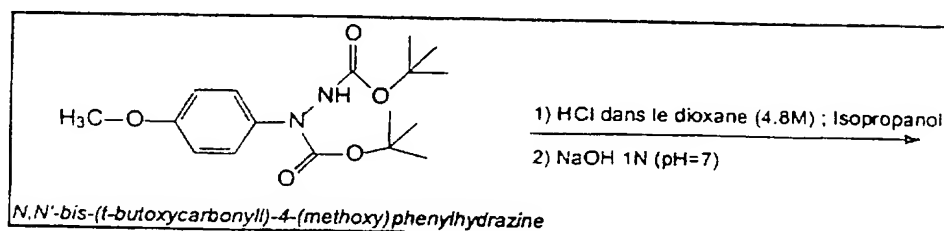
45



5

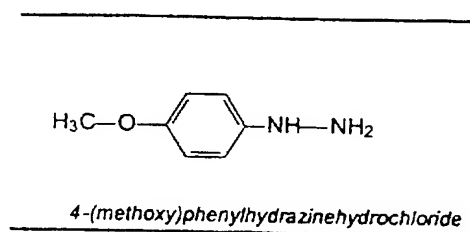
10 3<sup>ème</sup> étape : Déprotection

15



20

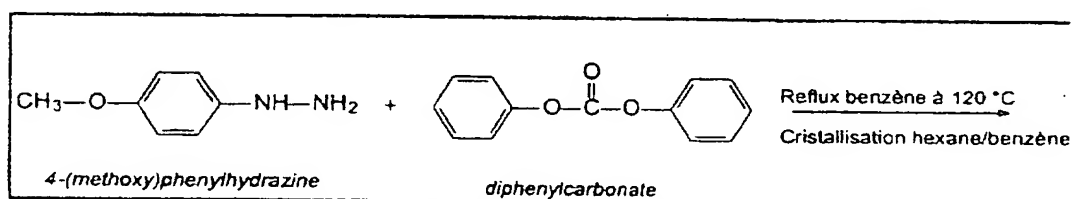
25



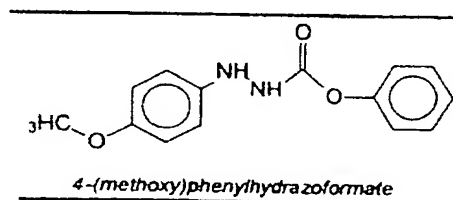
4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonate

30

35

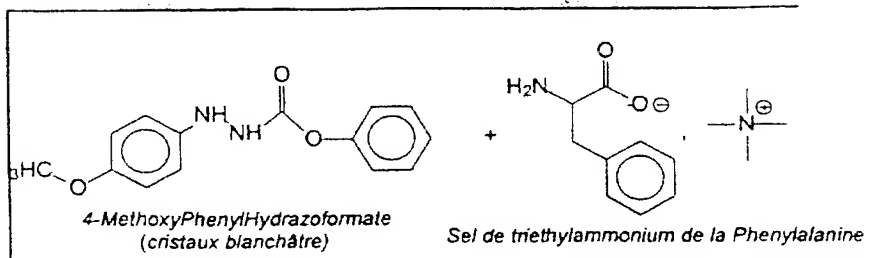


40

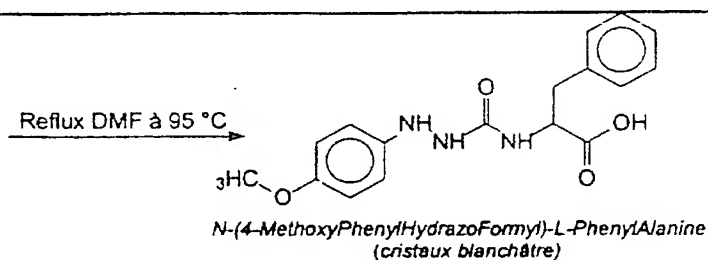


45 5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine

5

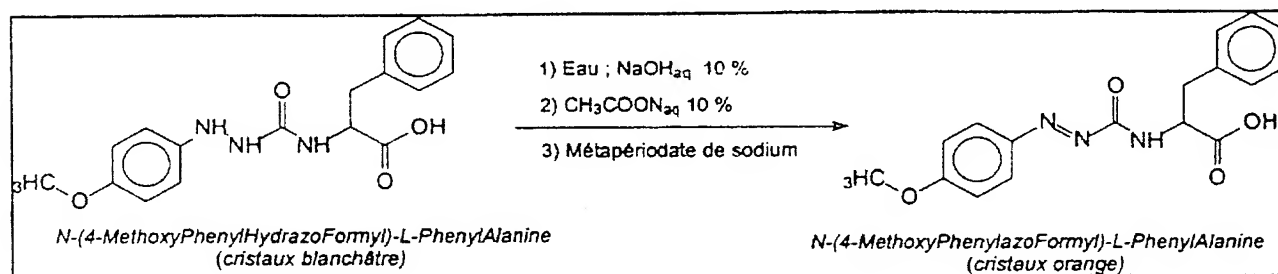


10



15

6<sup>ème</sup> étape : Oxydation ; Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"

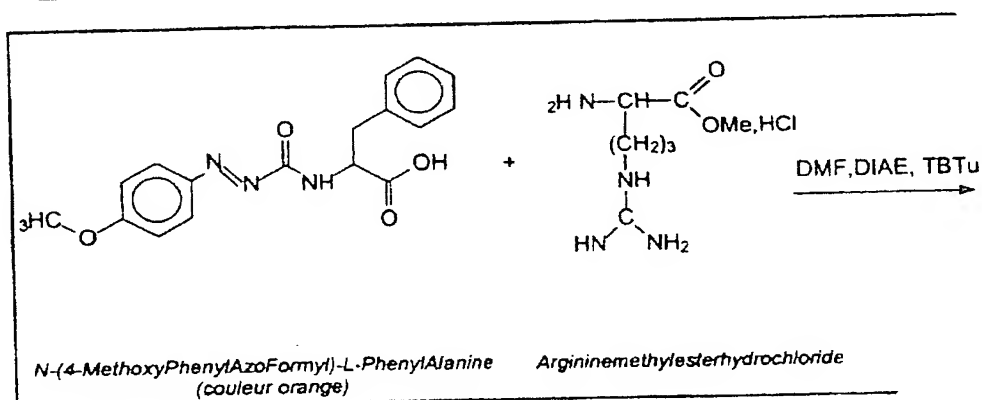


7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la Lysine

30

35

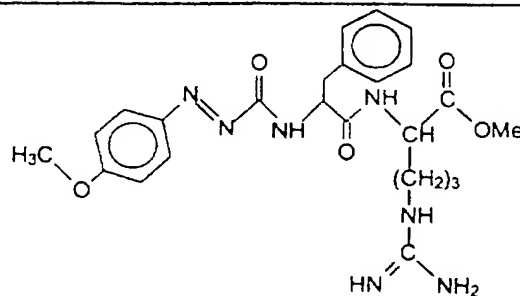
40



45



5

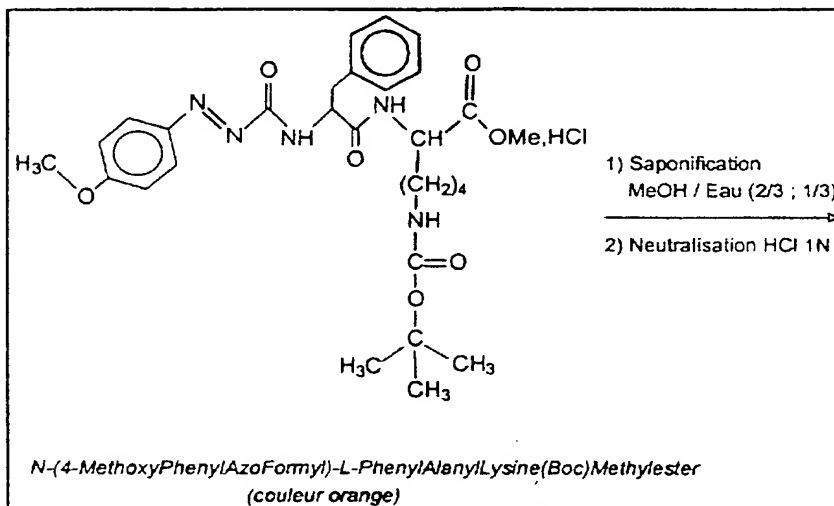


10

*N*-(4-MethoxyPhenylAzoFormyl)-L-PhenylAlanylArginineMethylester  
(couleur orange)

### 8<sup>ème</sup> étape : Saponification

15



20

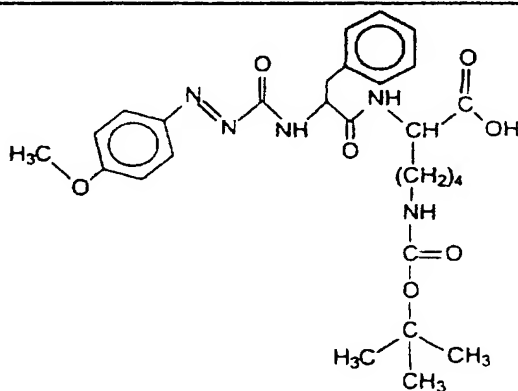
25

30

35

40

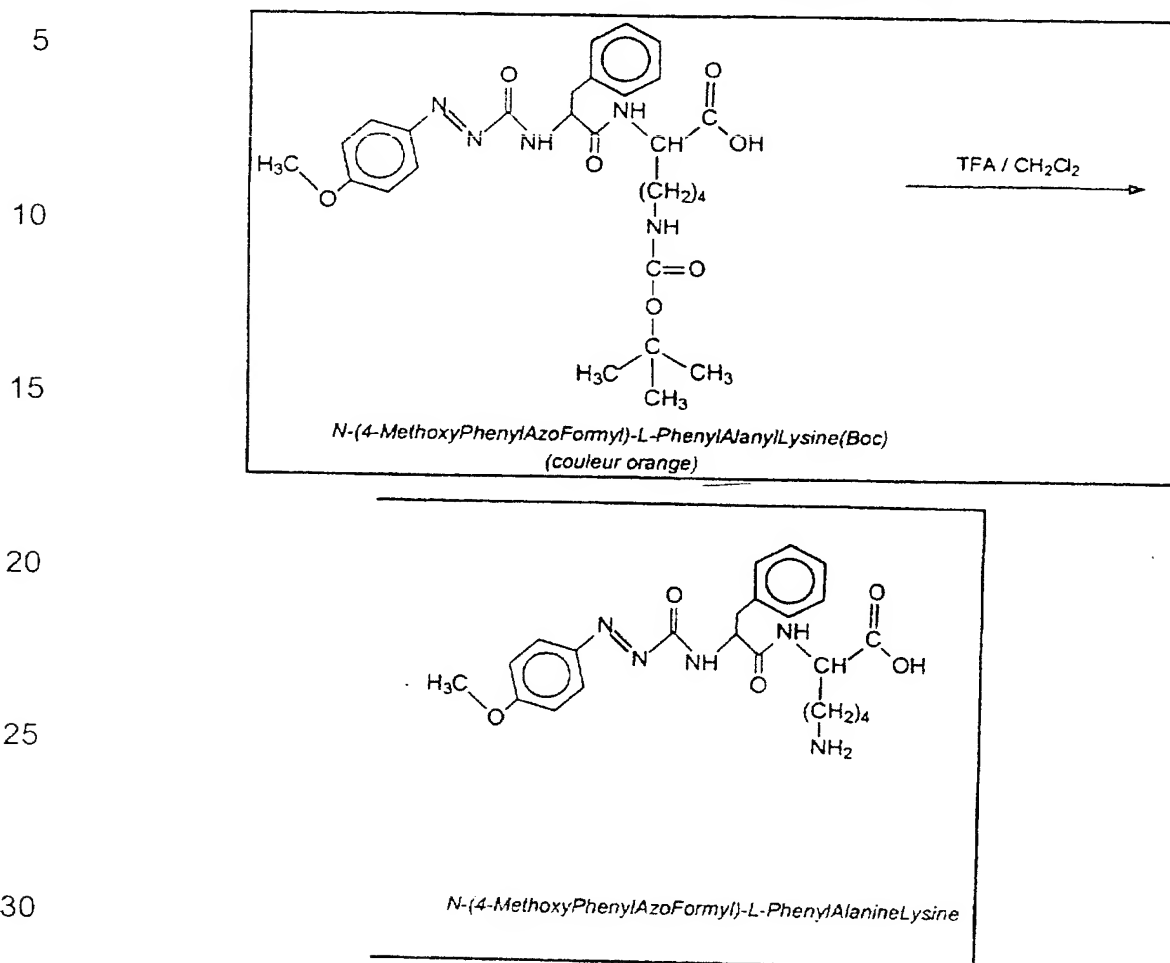
45



*N*-(4-MethoxyPhenylAzoFormyl)-L-PhenylAlanineLysine(Boc)

### 9<sup>ème</sup> étape : Déprotection

Ce composé particulier nécessite une étape supplémentaire pour déprotéger la chaîne latérale de la lysine ( $\epsilon$ -Boc :N- $\epsilon$ -tertiobutoxycarbonyl).



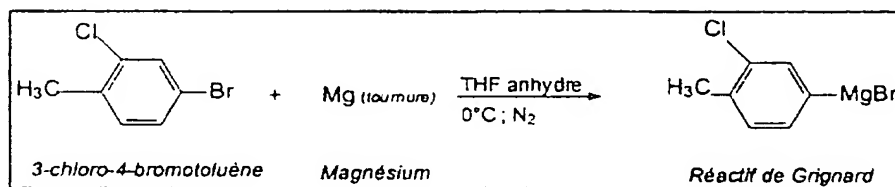
Mode opératoire : Reprendre 1 eq de N-(4-MethoxyPhenylAzoformyl)-L-Phenylalanyl-L-Lysine( $\epsilon$ -Boc) dans du dichloromethane (3mL/mmoL) dans un ballon. Placer sous agitation. Connecter une ampoule à brome contenant de l'acide trifluoroacétique (3mL/mmoL). Additionner lentement (goutte à goutte). Après 15 min, concentrer le milieu réactionnel et le purifier par chromatographie liquide haute performance. On obtient en finale une poudre orangée.

F/ Synthèse du 3-chloro-p-tolylazoformylphenylalanylarginine (Composé 6) :

1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard

Schéma réactionnel

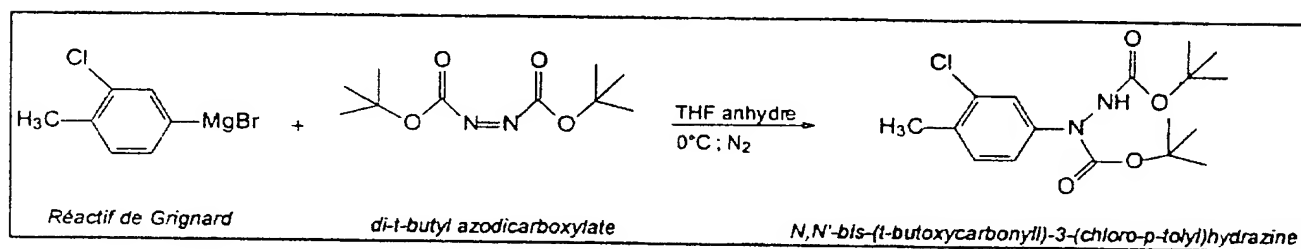
5



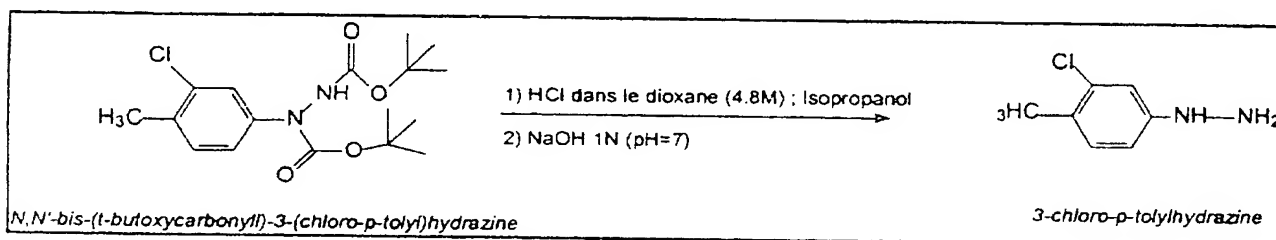
10

2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-t-butylazodicarboxylate

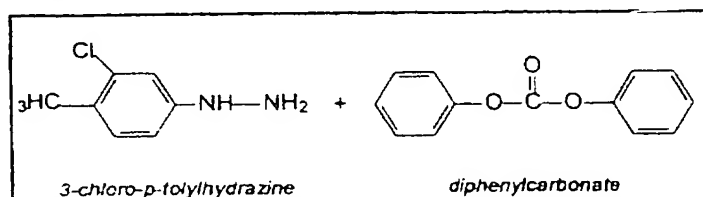
15

Schéma réactionnel

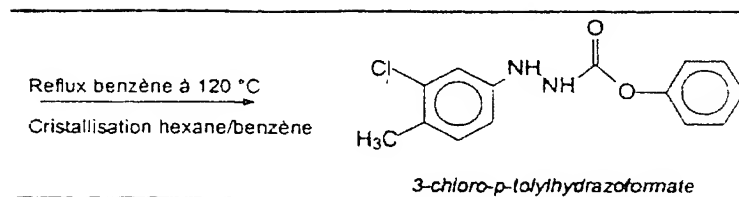
25

3<sup>ème</sup> étape : DéprotectionSchéma réactionnel4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonateSchéma réactionnel

45



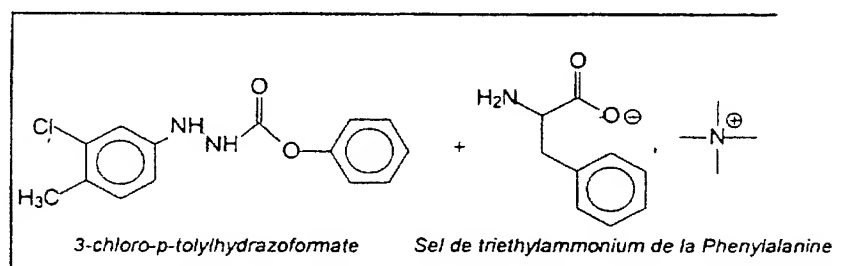
5



### 5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine

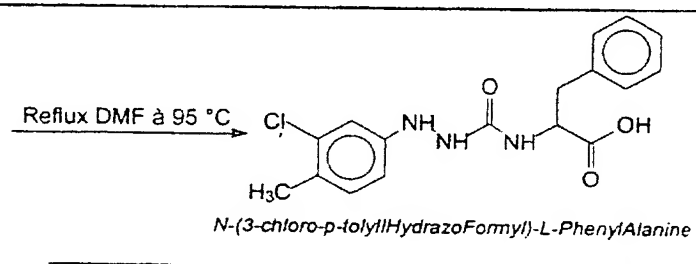
#### 10 Schéma réactionnel

15



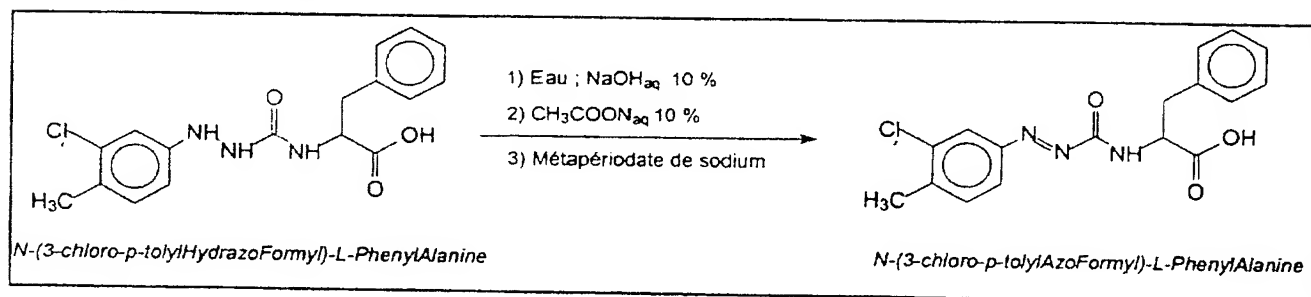
20

25



### 30 6<sup>ème</sup> étape : Oxydation ; Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"

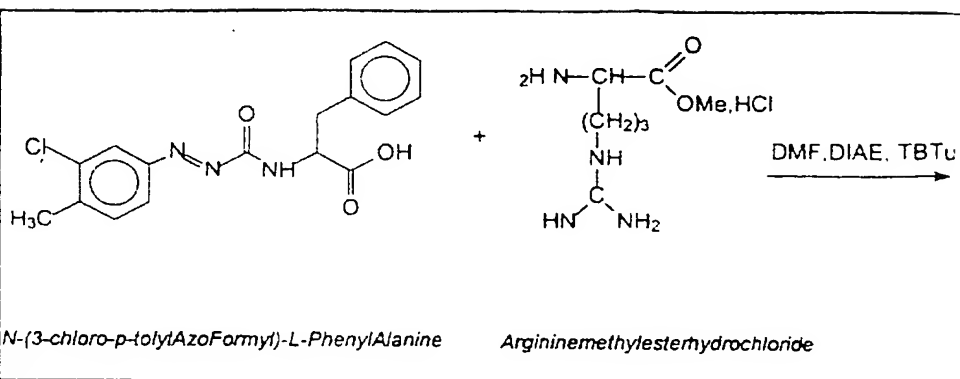
#### Schéma réactionnel



### 7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec l'Arginine

#### 45 Schéma réactionnel

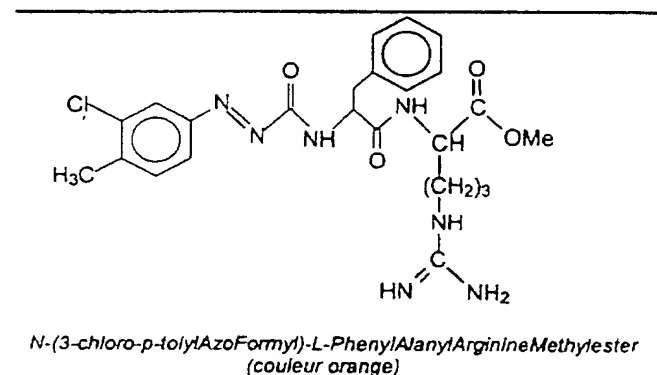
5



10

15

20



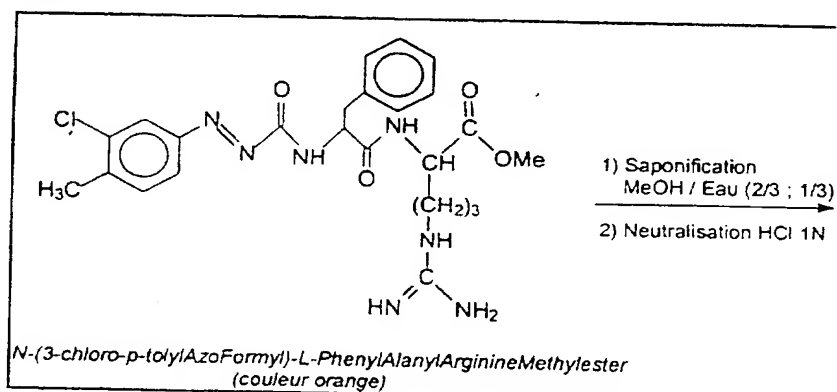
### 8<sup>ème</sup> étape : Saponification

25

#### Schéma réactionnel

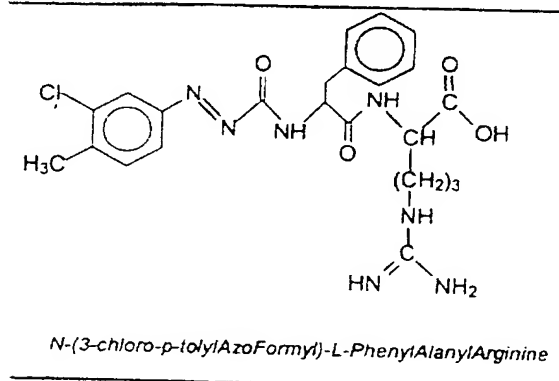
30

35



40

45



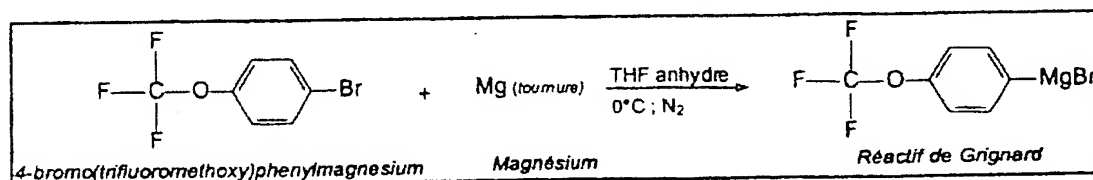
# G/ Synthèse du 3-chloro-p-tolylazoformylphenylalanylarginine (Composé 7) :

## 1<sup>ère</sup> étape : Réactif de Grignard

5

### Schéma réactionnel

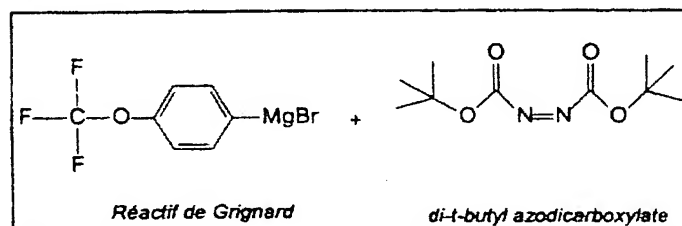
10



## 15 2<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le di-t-butylazodicarboxylate

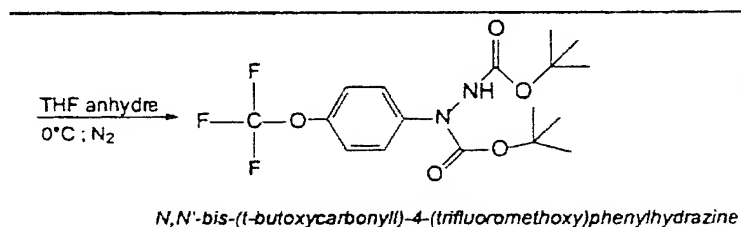
### Schéma réactionnel

20



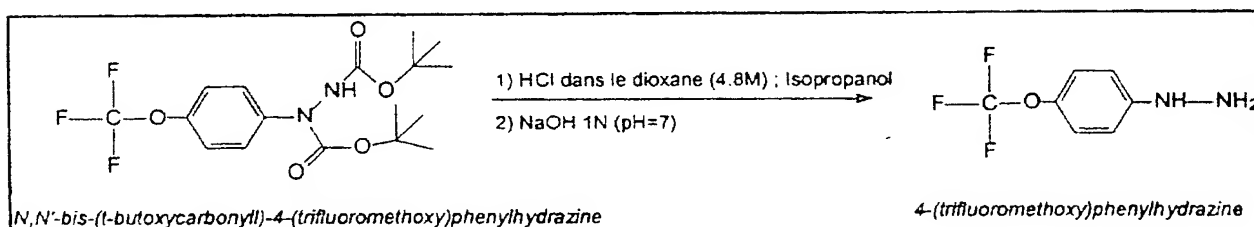
25

30



## 35 3<sup>ème</sup> étape : Déprotection

### Schéma réactionnel

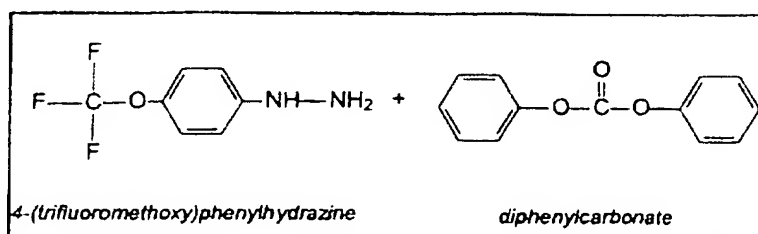


#### 4<sup>ème</sup> étape : Couplage avec le diphenylcarbonate

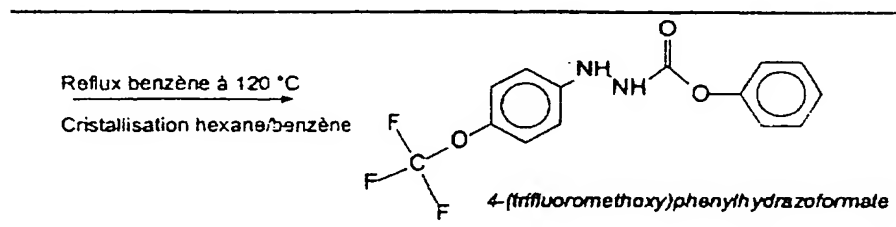
##### Schéma réactionnel

5

10



15



20

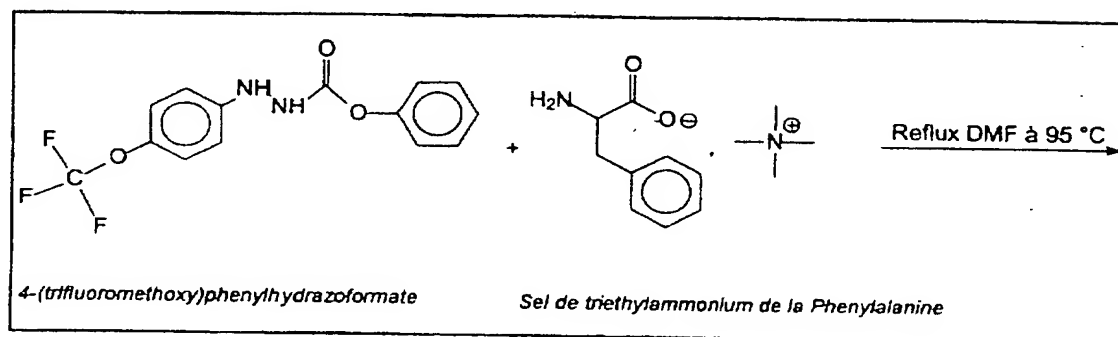
#### 5<sup>ème</sup> étape : Couplage avec la phénylalanine

##### Schéma réactionnel

25

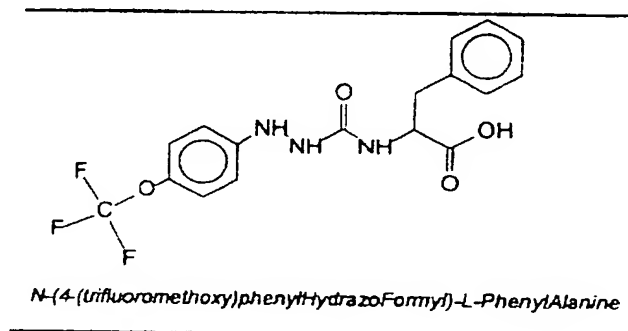
30

35



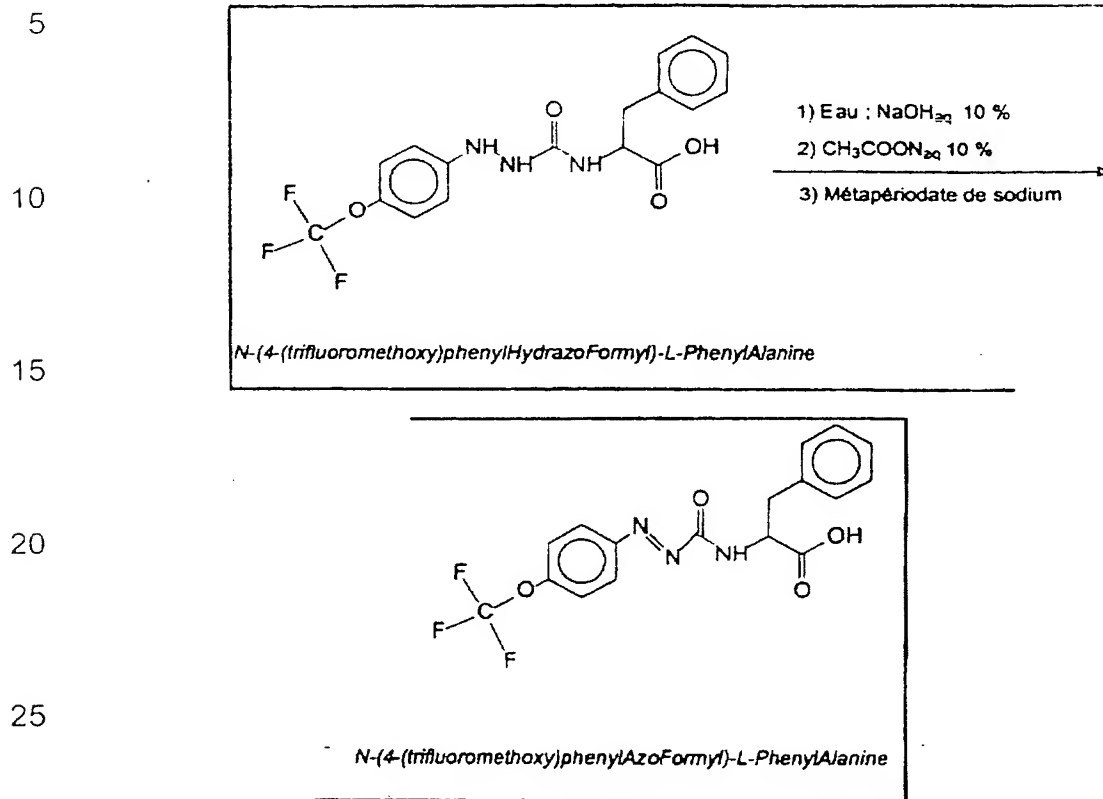
40

45



# 6<sup>ème</sup> étape : Oxydation : Passage de la forme "hydrazo" à la forme "azo"

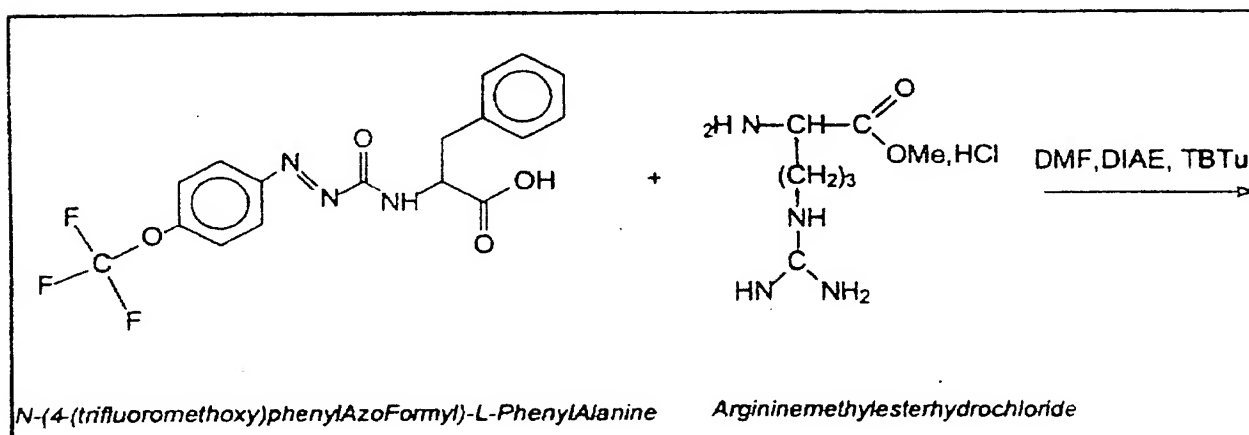
## Schéma réactionnel



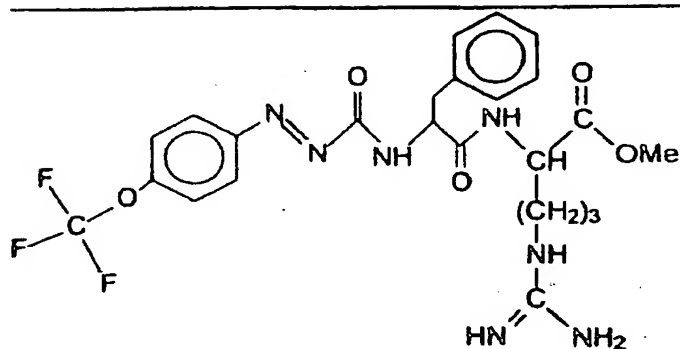
# 7<sup>ème</sup> étape : Couplage avec l'Arginine

30

## Schéma réactionnel



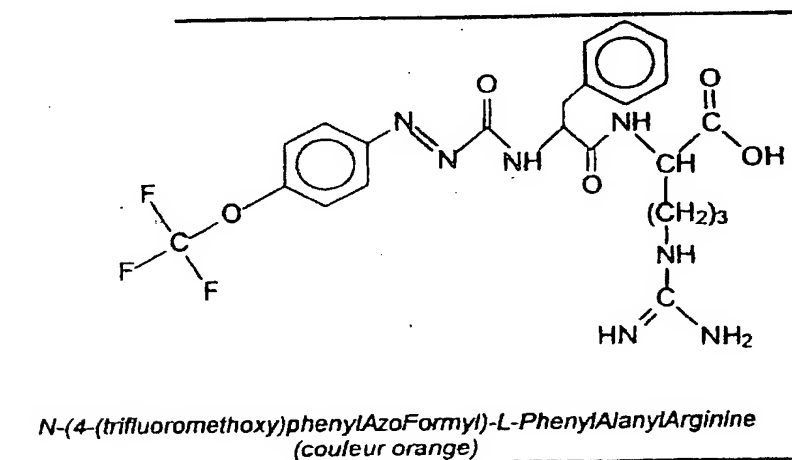
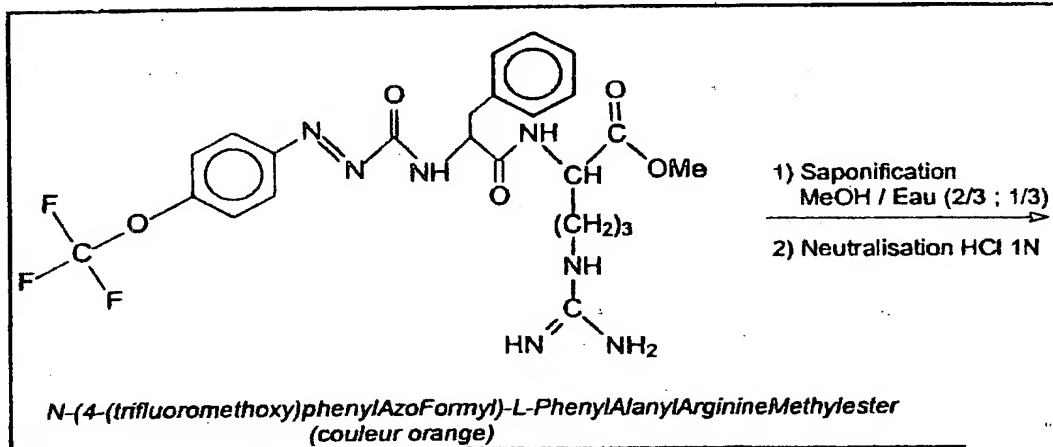




*N*-(4-(trifluoromethoxy)phenylAzoFormyl)-L-PhenylAlanylArginineMethylester

### 8<sup>ème</sup> étape : Saponification

#### 15 Schéma réactionnel



### EXEMPLE N° 2 :

Exemple de protocole de dosage de l'activité du TAFI selon la méthode de l'invention.

- 5 L'échantillon de plasma testé est divisé en deux aliquotes, l'un étant additionné de PCI (Calbiochem – Réf. 217359), l'autre de tampon hépès.  
Les deux aliquotes sont ensuite traités de manière identique selon le principe suivant :
- 10 150 µl de plasma dilué au 1/20 en tampon hépès (ou TAFI purifié à 13 µg/ml en tampon hépès.  
10 µl PCI ou H<sub>2</sub>O  
5 minutes à température ambiante  
150 µl tampon activateur de la coagulation
- 15 10 minutes à température ambiante  
100 µl PPACK + 100 µl MxPAFFR (5 mM)  
30 minutes à température ambiante  
100 µl HCl 1M + 100 µl NaOH 1M  
Dilution au 1/3 en tampon hépès
- 20 Lecture de la DO à 382 nm  
25 µl Carboxypeptidase A  
Lecture de la DO à 382 nm sur 1 minute

Autres variantes possibles :

- 25
  - on peut effectuer le dosage à une température de 37° C
  - le MxPAFFR peut être incorporé dès le départ, en même temps que le tampon activateur
  - la lecture peut être faite par HPLC

Concentrations préférées des différents produits :

- PPACK : H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone PM = 451 150  $\mu$ M (Bachem –  
5 Réf. N. 1065).
- Péfabloc : il peut être utilisé à la place du PPACK : 0.1 mM (Pentapharm – Réf. 399.01).
- MxPAFFR : 5 mM
- Carboxypeptidase A : origine pancréas bovin (Sigma – Réf. C 0386).
- 10 Flacon de 5.1 ml à 5000 unités, 21 mg prot/ml, 47 unités/mg protéine  
La CPA a été filtrée avec préfiltre, filtre 5  $\mu$ m et filtre 0.45  $\mu$ m, pour cela on a  
ajouté ml H<sub>2</sub>O.
- PCI : utilisé à 0,38 mM
- 15 1 mg de PCI peut inhiber environ 8 mg de TAFI (50 U/mg) à 50 % selon  
indications du fournisseur (Calbiochem).

Tampon activateur :

- La voie d'activation préférée de la coagulation dans le cadre de la présente  
20 invention est la voie d'activation par le complexe thrombine/thrombomoduline.  
Dans ce cas, le tampon activateur utilisé comprend les constituants suivants :
- 37  $\mu$ l thrombomoduline de 0 à 80 nM et préférentiellement à 10 nM (Rabbit lung  
thrombomodulin - American Diagnostica - Réf. 237).
- 25 6  $\mu$ l thrombine de 0,2 à 10 NIH/ml et préférentiellement à 0,8 NIH/ml  
(Diagnostica Stago – Produit de recherche).
- 750  $\mu$ l chlorure de calcium de 0 à 80 nM et préférentiellement à 40 nM
- 705  $\mu$ l tampon HEPES 9.4 mM pH = 7.6
- 30 Les concentrations sont données pour un volume final de 1498  $\mu$ l de tampon  
activateur.

N.B. : Le tampon hépès contient : Hépès 20 mM, KCl 4 mM et BSA 1% d'autres essais ont été réalisés avec Hépès 20 mM et NaCl 150 mM.

- Comme cela l'a été indiqué dans la description, d'autres voies d'activation sont possibles dont notamment la voie d'activation par le facteur XIa.

Dans ce cas un exemple de tampon activateur contient les constituants suivants :

- 5 µl thrombomoduline à 30 U/ml
- 30 µl Facteur XIa pur (Calbiochem – Réf. 233483).
- 88 µl tampon hépès pH = 7.4 (Hépès 20 mM et NaCl 150 mM).

Les concentrations étant données à titre d'exemple et peuvent être réajustées par l'homme du métier.

### Exemple n° 3 :

#### Etablissement d'une gamme d'étalonnage.

- La figure 3 ci-après représente une courbe d'étalonnage établie à partir d'un plasma déficient en TAFI surchargé avec du TAFI purifié pour obtenir une gamme de concentration en TAFI allant de 0 à 26 µg/ml.

Le composé de formule I utilisé est le MxPAAFR à une concentration de 5 mM.

Les  $\Delta$  DO mesurés selon la méthode de l'invention sont reportés dans le tableau

III suivant :

**TABLEAU III :**

Concentration en TAFIa (µg/ml)	0	1.63	3.25	6.5	13	26
$\Delta$ DO mesuré	0.168	0.217	0.273	0.399	0.624	0.995

Comme cela apparaît sur la figure 3, la courbe d'étalonnage est linéaire pour les gammes de concentrations étudiée. Celle-ci couvre largement la zone de normalité, le TAFI étant présent dans l'organisme à des concentrations allant de 5 à 15 µg/ml.

- 5 La méthode de l'invention permet donc de descendre aussi bien des déficits en TAFI que des taux anormalement élevés.

#### Exemple n° 4 :

10

#### Résultats obtenus sur différents types de plasmas.

La méthode de l'invention a été appliquée sur différents types de plasmas selon le protocole décrit dans l'exemple n° 2.

15

#### *Plasmas frais, plasmas congelés :*

- On peut effectuer le dosage sur plasma frais ou plasmas congelés mais on observe une diminution de DO entre les deux. Celle-ci résulte d'une légère  
20 dégradation du TAFI lors de la décongélation (la protéine se dégrade).

#### Plasmas frais

9.4 µg/ml  
11.2 µg/ml  
10.7 µg/ml

#### Plasmas congelés

6.0 µg/ml  
6.5 µg/ml  
5.6 µg/ml

#### *Plasma congelé, plasma lyophilisé :*

- 25 Sur un plasma lyophilisé, le dosage de TAFI est possible et similaire à un plasma congelé.

	<u>Plasma congelé</u>	<u>Plasma lyophilisé</u>
Δ DO :	0.302	0.354

*Plasma d'origine diverse congelés :*

	Thrombolytique	2.9 µg/ml	
5	CIVD	2.8 µg/ml	
	Cirrhose	1.4 µg/ml	
	Maternité	7.1 µg/ml	
	Hyperfibrinogénémie	4.6 µg/ml	
	HNF	6.1 µg/ml	(héparines non fractionnées)
10	AVK	5.8 - 8.2 – 6.5 – 7.1 µg/ml	(anti-vitamine K).

#### Exemple n° 5 :

Dosage réalisés avec différents substrats de l'invention.

15

La méthode de l'invention a été appliquée sur une solution contenant du TAFI purifiée, avec différents composés décrits dans l'Exemple n° 1.

20 Le test est réalisé sur une solution à 6,5 µg/ml de TAFI purifié dans du tampon hépès. Les résultats sont reportés sur le tableau IV ci-après.

**TABLEAU IV :**

Composés	Lecture	DO de départ	DO finale	Delta DO
<u>2,3 DMPAFFR</u> 5 mM	350 nm	0.318	0.089	0.229
<u>2,4 DMPAFFR</u> 5 mM	330 nm	1.004	0.087	0.917
<u>2,5 DMPAFFR</u> 5 mM	320 nm	0.973	0.131	0.842
<u>AAFFK</u> 5 mM	320 nm	0.973	0.131	0.842

25

#### **EXEMPLE N° 6 :**

Spécificité du TAFIa pour les composés de formule (I) de l'invention :

L'exemple ci-après vise à démontrer la nécessité d'utiliser la méthode et les composés de formule (I) de l'invention pour doser spécifiquement l'activité des CPN ou U, en particulier le TAFI, par rapport à d'autres carboxypeptidases basiques.

1. Le dosage est dans ce cas réalisé avec un substrat de la famille de composés décrites par Mock dans (14). Ce substrat est constitué d'un seul acide aminé porteur du radical chromophore anizylazoformyl (portion  $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{-N}=\text{N-CO-}$ ). L'acide aminé choisi est l'arginine, un acide aminé basique normalement hydrolysé par les carboxypeptidases B (1).

Ce substrat est dénommé ci-après AAFR (AnizylAzoFormyArginine) ou MxAFR (4-MethoxyphenylAzoformylarginine).

Ce substrat (0,25 mM) est mis en présence soit d'un échantillon de TAFI plasmatique, soit d'une solution de carboxypeptidase B pancréatique porcine (Sigma – Réf. C9584) à 5,2 mol/l.

La diminution de coloration de chacun des deux échantillons est suivie au spectrophotomètre. Chacun des échantillons est traité selon le protocole suivant :

a) *échantillon de départ :*

- TAFI plasmatique (présent dans un pool normal de plasmas – dilué au 1/20) ou
- Carboxypeptidase B pancréatique porcine 5,2 mol/l (dans tampon hépès)

b) activation avec complexe thrombine-thrombomoduline- $\text{CaCl}_2$  (voir exemple 2) pour l'échantillon de TAFI plasmatique.

c) addition de AAFR à 5 mM.

d) lecture DO à 382 nm.

5

### **Résultats :**

à 382 nm	DO de départ	DO finale	Delta DO
CPB porcine	1.054	0.445	0.608
TAFIa du plasma	1.730	1.681	0.049

### **Conclusion :**

10

Le TAFI activité n'hydrolyse pas le AAFR contrairement à la CPB pancréatique.

2. La méthode de l'invention est ensuite appliquée sur une solution de TAFI purifiée, soit avec un substrat de formule (I) (MxPAFFK), soit avec le MxAFR pour vérifier que le TAFIa hydrolyse néanmoins un composé de formule (I). L'activation de la coagulation est déclenchée par le complexe thrombine-thrombomoduline-CaCl<sub>2</sub> (voir protocole exemple 2).

15

La diminution de coloration de chacun des deux échantillons est suivie au spectrophotomètre.

20

a) échantillons de départ : solution de TAFI purifié à 18 µg/ml (dilué dans tampon hépès).

b) activation de la coagulation.

25

c) addition de MxAFR 27 mM ou MxPAFFK (témoin) concentration du MxPAFFK.

d) addition de CPA dans l'échantillon contenant le MxPAFFK.

e) lecture DO à 382 nm.



**Résultats :**

	DO de départ	DO finale	Delta DO
TAFIa + MxAFR	1.356	1.300	0.056
TAFIa + MxPAFFK	1.397	0.849	0.548

**5 Conclusion :**

Le TAFI activé n'hydrolyse pas le MxAFR alors qu'il est actif sur le MxPAFFK.

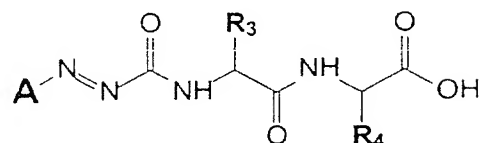
**BIBLIOGRAPHIE :**

1. BOUMA. B.N. et al : "Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI, Plasma Procarboxypeptidase B, Procarboxypeptidase R, Procarboxypeptidase U)". *Thromb. Research*, 101:329-354, 2001.
2. BAJZAR L. : "Purification and Characterization of TAFI, a Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor". *J. of Biol. Chem.*, 270, 24:14477-14484, 1995.
3. JUHAN-VAGUE I., ALESSI M.-C. : "TAFI : lien moléculaire entre les processus de coagulation et de fibrinolyse". *Sang Thrombose Veineuse*, 5, 10:314-6, 1998.
4. SCHATTEMAN K. et al. : "Carboxypeptidase U at the interface between coagulation and fibrinolysis". *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis*, 7(2):93-101, 2001.
5. WOLF M. et al. : "The kinetics of carboxypeptidase B activity". *J. of Biol. Chem.*, 237, n° 10, Octobre 1962.
6. SUZUKI S. et al. : "Spectrophotometric determination of glycine with 2,4,6-Trichloro-s-Triazine". *Analytical Chemistry*, Vol. 42, N° 1, January 1970.
7. LORENTZ K. et al. : "Determination of carboxypeptidase B in duodenal contents". *Clinica Chimica Acta*, 37:515-517, 1972.
8. PLUMMER Th. H. et al. : "An improved spectrophotometric assay for human plasma carboxypeptidase N". *Analytical Biochemistry*, 108:348-353, 1980.
9. FISCHER G.H. et al. : "Synthetic inhibitors of carboxypeptidase N". *Adv. Experimental Med. Biol.*, 198, Part A, 405-410, 1986.
10. SARUTA H. et al. : "Colorimetric determination of carboxypeptidase A activity in serum". *Clin. Chem.* 32:5, 748-751, 1986.
11. NAM-JOO HONG et al. : "Development of substrate for carboxypeptidase B by employing Thiaarginine peptides". *Bull Korean Chem. Soc.*, Vol. 19, N° 2, 189-93, 1998.
12. MOCK W. L. et al. : "Arazoformyl Dipeptide Substrates for Thermolysin. Confirmation of a Reverse Protonation Catalytic Mechanism". *Biochemistry*, 35: 7369-7377, 1996.

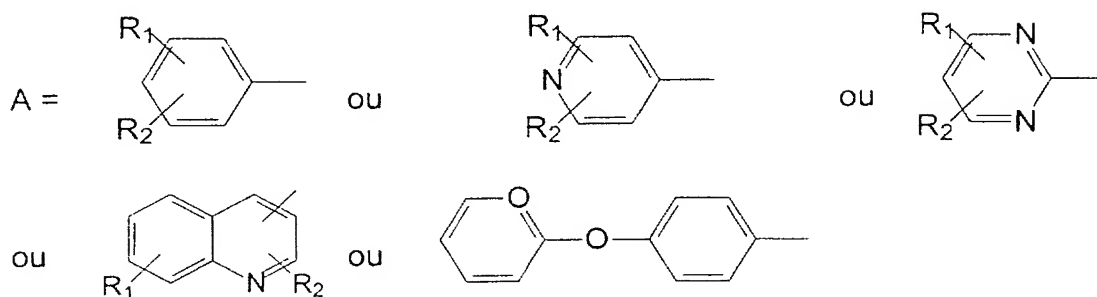
13. MOCK W. L. et al. : "Arazoformyl Peptide Surrogates as Spectrophotometric Kinetic Assay Substrates for Carboxypeptidase A". *Analytical Biochemistry*, 239:218-222, 1996.
14. MOCK W. L. et al. : "Catalytic activity of carboxypeptidase B and of  
5 carboxypeptidase Y with anisylazoformyl substrates". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9:187-192, 1999.
15. HATTON M.W. : "Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme". *Biochem.*  
10 *J.*, 131(4):799-807, 1973.
16. STOCKER K. et al. : "The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin)". *Methods Enzymol.* 45:214-223, 1976.
- 15 17. DENSON K.W.E. : "Clot-inducing substances present in such venoms with particular reference to *Echis carinatus* venom". *Thromb. Res.*, 8:351-360, 1976.
18. ROSING J. et al. : "Structural and functional properties of snake venom  
20 prothrombin activators". *Toxicon*, 30(12):1515-1527, 1992.

**REVENDEICATIONS**

1. Composé de formule (I) suivante :



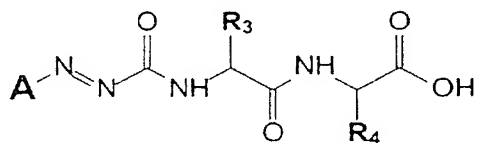
5 dans laquelle :



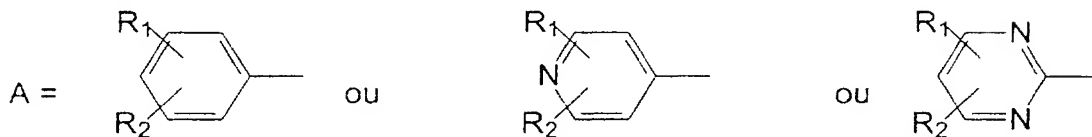
- R1, R2 = H, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Cl, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -SCH<sub>3</sub>
- R<sub>3</sub> = un radical d'acide aminé hydrolysable par une carboxypeptidase A.

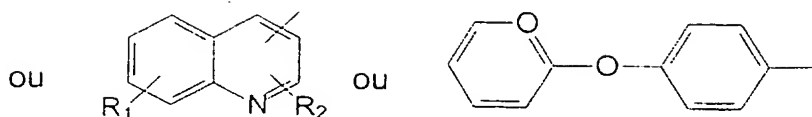
10 - R<sub>4</sub> = un radical d'acide aminé basique.

2. Composé selon la revendication 1 de formule (I) suivante :



dans laquelle :





- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Cl, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -SCH<sub>3</sub>

- R<sub>3</sub> = un radical d'acide aminé hydrophobe.

5 - R<sub>4</sub> = un radical arginine ou lysine.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R<sub>3</sub> est choisi parmi les radicaux d'acides aminés suivants :

- 10
- la phenylalanine,
  - l'alanine,
  - la valine,
  - la leucine,
  - l'isoleucine,
  - la phénylglycine.

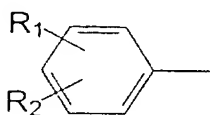
15

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R<sub>3</sub> représente la phenylalanine.

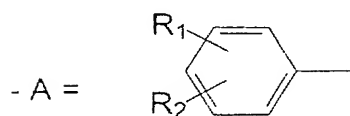
20 5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R<sub>3</sub> représente la phenylalanine et R<sub>4</sub> l'arginine ou la lysine.

6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R<sub>1</sub> est choisi parmi : -H et -CH<sub>3</sub>, et, R<sub>2</sub> est choisi parmi CH<sub>3</sub> et O-CH<sub>3</sub>.

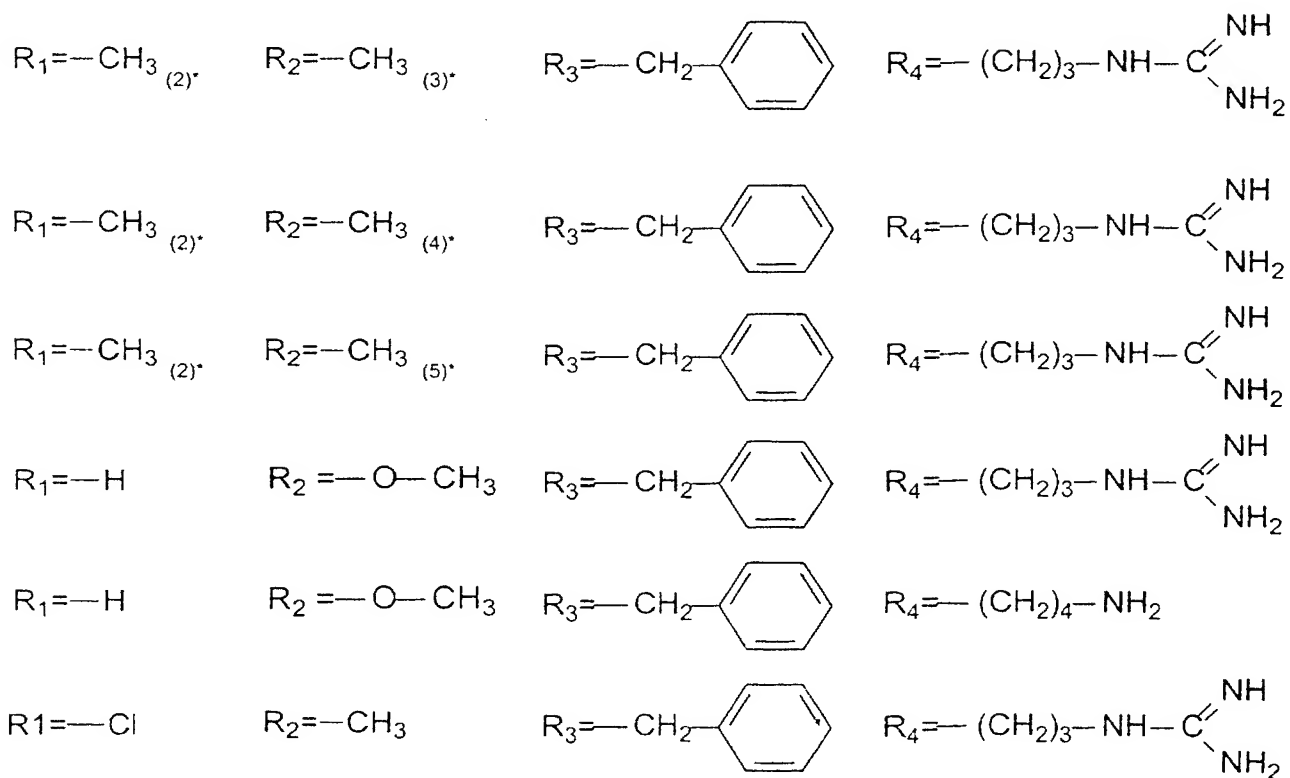
25 7. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que A est

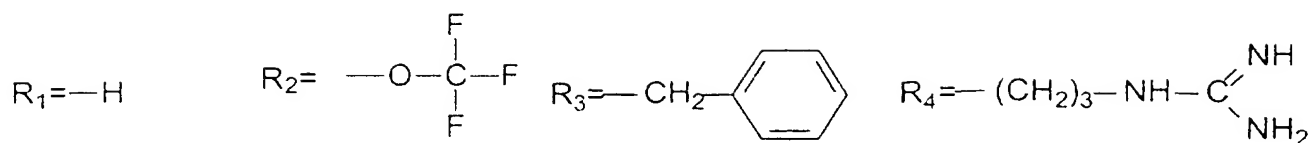


8. Composé selon la revendication 1 de formule (I), dans laquelle



5 ledit composé étant choisi au sein du groupe constitué par les composés suivants dans lesquels :





\* les chiffres entre parenthèses déterminant la position des groupements methyl sur le radical phényl.

5            9. Méthode de dosage de l'activité d'une carboxypeptidase N ou une carboxypeptidase U dans un échantillon biologique, dans laquelle :

- on met en contact ledit échantillon avec un composé de formule (I) selon la revendication 1, et une carboxypeptidase A, dans des conditions permettant l'hydrolyse de l'échantillon et,

10           - on mesure la diminution de coloration de l'échantillon contenant le substrat de formule (I) et la carboxypeptidase A, résultant de la double hydrolyse du substrat de formule (I) par la CPN ou la CPU de l'échantillon et par la CPA.

15           10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que  $R_4$  est un radical arginine ou lysine.

11. Méthode selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que le substrat est un composé de formule (I) dans lequel  $R_3$  est choisi parmi les radicaux d'acides aminés suivants :

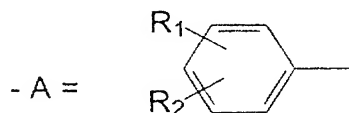
- 20           - la phénylalanine,  
               - l'alanine,  
               - la valine,  
               - la leucine,  
               - l'isoleucine,  
 25           - la phénylglycine.

12. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le substrat est un composé de formule (I) dans lequel  $R_3$  représente la phénylalanine.

13. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le substrat est un composé de formule (I) dans lequel  $R_3$  représente la phénylalanine et  $R_4$  l'arginine ou la lysine.

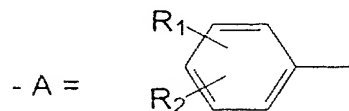
14. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisée en ce que le substrat est un composé de formule (I) dans lequel  $R_1$  est choisi parmi  $-H$  et  $-CH_3$ , et,  $R_2$  est choisi parmi  $CH_3$  et  $O-CH_3$ .

15. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le substrat est un composé de formule (I) dans lequel :



15

16. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le substrat est un composé de formule (I) dans laquelle :

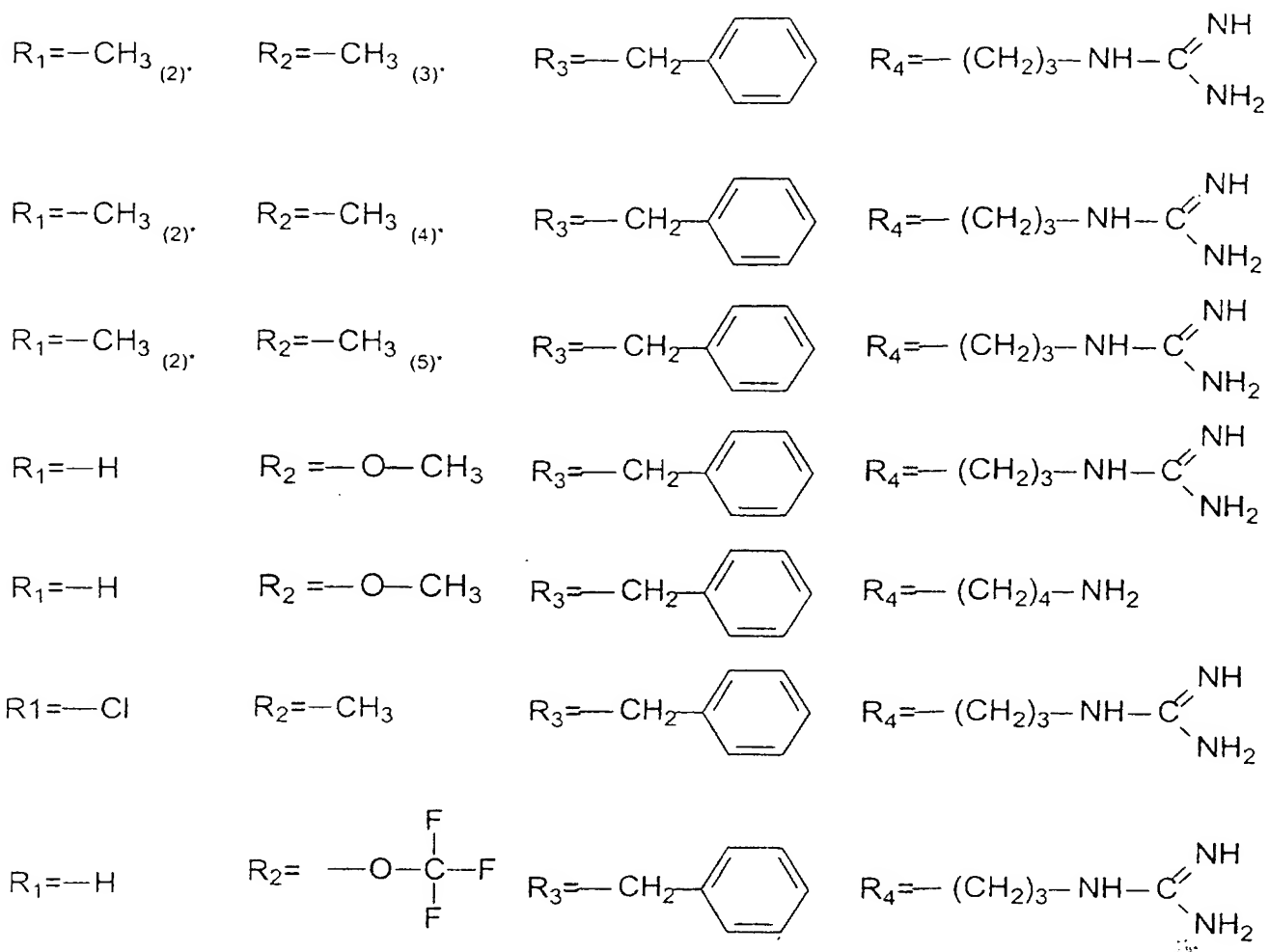


20

ledit composé étant choisi au sein du groupe constitué par les composés suivants, dans lesquels :

25





\* les chiffres entre parenthèses déterminant la position des groupements methyl sur le radical phényl.

5 17. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 16, caractérisée en ce que la densité optique du mélange est mesurée sans addition de CPA, puis après addition de CPA.

10 18. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 17, caractérisée en ce que la diminution de coloration mesurée est comparée avec des valeurs

portées sur une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'un échantillon déficient en la CPN ou CPU étudiée, surchargé avec cette enzyme purifiée.

19. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 18, caractérisée  
5 en ce que l'échantillon est un échantillon sanguin.

20. Méthode selon la revendication 19, caractérisée en ce que l'échantillon est du plasma.

10 21. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 20, caractérisée en ce que la CPA est de la CPA pancréatique.

22. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 21, caractérisée en ce que l'échantillon à tester est mis en présence d'un tampon activateur le  
15 temps nécessaire pour obtenir l'activation de la carboxypeptidase N ou U dont on veut mesurer l'activité, puis en présence d'un inhibiteur des serine protéases.

23. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que le substrat de formule (I) est ajouté en même temps que le tampon activateur, ou simultanément  
20 ou immédiatement après l'inhibiteur des sérine protéases.

24. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que l'activation est réalisée par la voie du complexe thrombine/thrombomoduline.

25 25. Méthode pour doser l'activité de la CPN ou la CPU constitutionnelle d'un échantillon et celle de la CPN ou la CPU activable du même échantillon, caractérisée en ce qu'on compare l'activité d'hydrolyse de l'échantillon sur un substrat de formule (I) après mise en présence de l'échantillon avec un tampon activateur le temps nécessaire pour obtenir l'activation de la carboxypeptidase N  
30 ou U dont on veut mesurer l'activité, puis en présence d'un inhibiteur des serine protéases, l'activité d'hydrolyse observée étant comparée avec l'activité

d'hydrolyse de l'échantillon sur un substrat de formule (I) en l'absence de tampon activateur selon la revendication 9.

26. Méthode selon l'une quelconque des revendications 9 à 22, caractérisée  
5 en ce que la carboxypeptidase est une CPU.

27. Méthode selon la revendication 26, caractérisée en ce que la CPU est le TAFI.

10 28. Méthode selon l'une quelconque des revendications 22 à 27, caractérisée en ce que l'échantillon est traité en présence et en absence d'un inhibiteur spécifique du TAFI.

29. Méthode selon l'une quelconque des revendications 22 à 28,  
15 caractérisée en ce que l'inhibiteur spécifique du TAFI est le CPI.

30. Méthode de dosage du TAFI activé dans un échantillon sanguin, comprenant les étapes suivantes :

20 a) mise en présence d'un aliquote n° 1 de l'échantillon avec un inhibiteur spécifique du TAFI, et traitement de celui-ci selon la méthode de la revendication 22,

b) traitement d'un aliquote n° 2 de l'échantillon selon la méthode de la revendication 22, en l'absence d'inhibiteur spécifique du TAFI,

25 c) mesure du  $\Delta$  DO entre l'aliquote n° 1 et l'aliquote n° 2, représentatif de l'activité du TAFI activé dans l'échantillon.

31. Méthode selon la revendication 30 pour différencier l'activité du TAFI constitutionnel et celle du TAFI activable du même échantillon, caractérisée en ce  
30 que l'on mesure l'activité d'hydrolyse d'un troisième aliquote de l'échantillon sur un substrat de formule (I) en l'absence de tampon activateur.

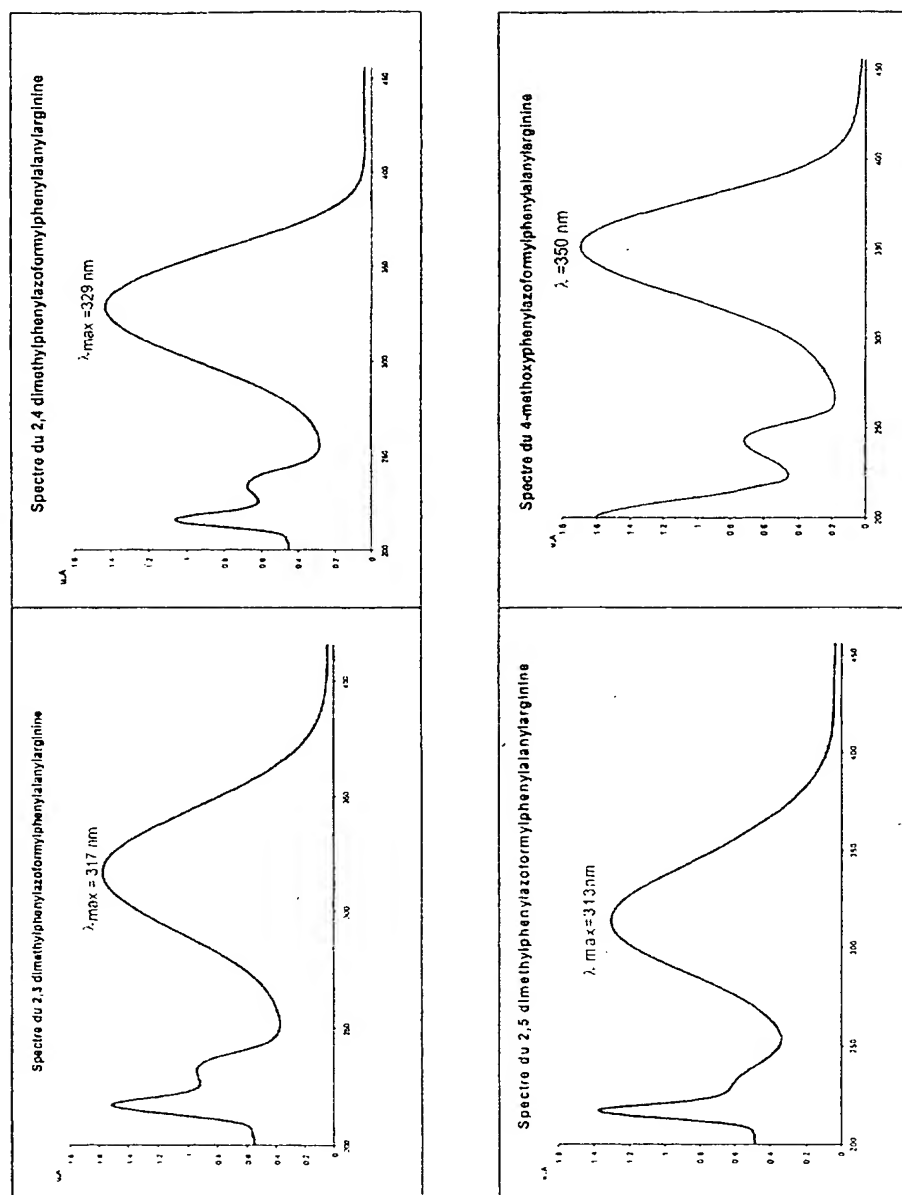
32. Utilisation d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour doser l'activité enzymatique d'une carboxypeptidase N ou U dans un échantillon.

5        33. Utilisation selon la revendication 32 caractérisée en ce que la carboxypeptidase est le TAFI.

34. Kit pour doser l'activité d'une CPN ou une CPU dans un échantillon comprenant un substrat chromogène constitué par un composé selon l'une  
10        quelconque des revendications 1 à 8.

35. Kit pour doser l'activité du TAFI dans un échantillon biologique, comprenant

- un activateur du TAFI,
- 15        - de la carboxypeptidase A,
- un substrat de formule (I),
- un inhibiteur du TAFI,
- un inhibiteur des serine protéases.

**Figure 1A**

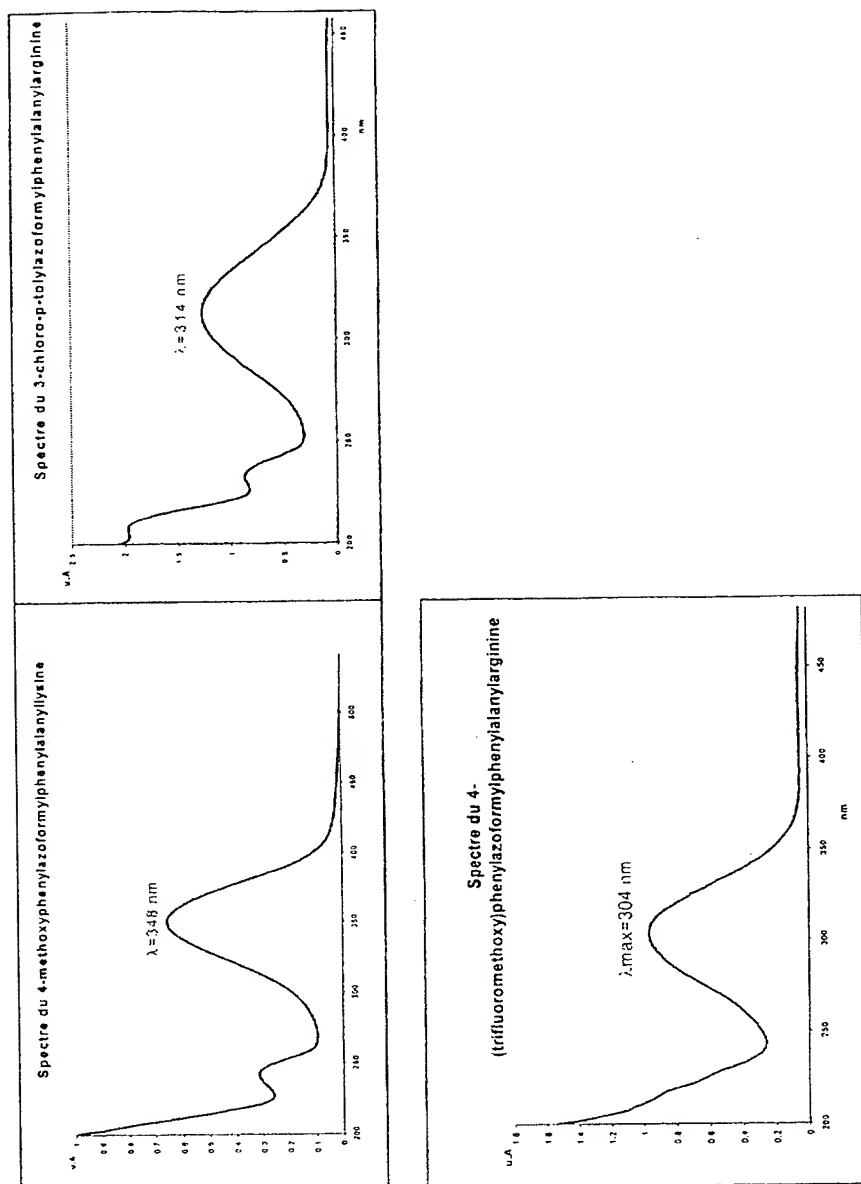
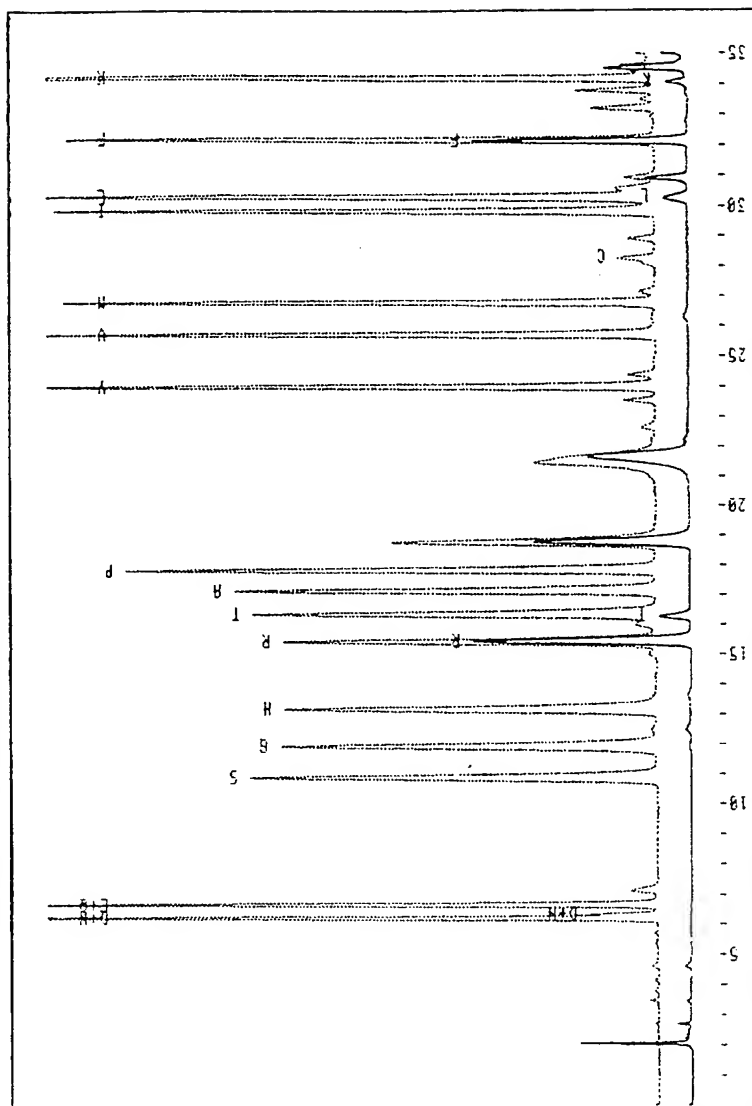
**Figure 1B**

Figure 2 :

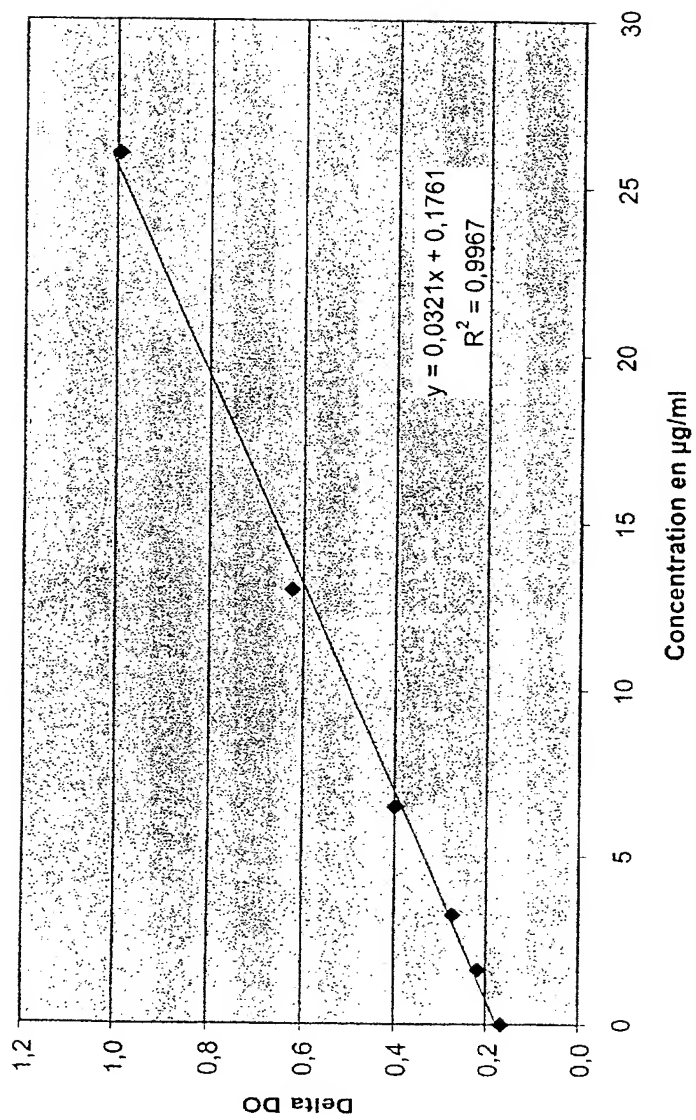
# SUPERPOSITION D'UN STANDARD ET DU MxAFFR

(-MxAFFR lot :KF6-020D ( trait plein) -Standard (en pointillé))



R = Arginine  
F = Phenylalanine

Figure 3 :





# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
<b>Référence des documents</b> (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	<b>Revendications du brevet concernées</b>
NEANT	
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
<p>W L MOCK ET AL. : " Catalytic activity of carboxypeptidase B and of carboxypeptidase Y with anisylazofornyl substrates "</p> <p>BIOORGANIC &amp; MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, Vol. 9, 1999, pages 187-192, XP004152597 OXFORD, GB ISSN : 0960-894 X</p> <p>W L MOCK ET AL. : " Arazofornyl peptide surrogates as spectrophotometric kinetic assay substrates for carboxypeptidase A "</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY., Vol. 239, 1996, pages 218-222, XP002196534 ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK., US ISSN : 0003-2697</p> <p>W L MOCK &amp; D J STANFORD : " Arazofornyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism "</p> <p>BIOCHEMISTRY., Vol. 35, no. 23, 1996, Pages 7369-7377, XP002196535 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA., US ISSN : 0006-2960</p> <p>K A SCHATTEMAN ET AL. : " Assay of procarboxypeptidase U, a novel determinant of fibrinolytic cascade, in human plasma "</p> <p>CLINICAL CHEMISTRY., Vol. 45, no. 6, juin 1999 (1999-06), Pages 807-813, XP002196536 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN : 0009-9147</p>	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
<b>Référence des documents</b> (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	<b>Revendications du brevet concernées</b>
NEANT	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

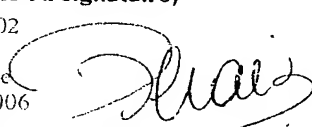
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DE 113 W / 760899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		134947-AD	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0109030	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) NOUVEAUX SUBSTRATS CHROMOGENES ET LEUR UTILISATION POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITE DE CARBOXYPEPTIDASES.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> SOCIETE DIAGNOSTICA-STAGO  Représentée par : ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde - FR-75008 PARIS			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		QUENTIN	
Prénoms		Gérard	
Adresse	Rue	8 Le Grand Epinay	
	Code postal et ville	28160	YEVRES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Le 28 juin 2002 DESAIX Anne CPI No. 93.3006			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)